
OOGENESE IN HYDRA VULGARIS

Marsha Schade

Dissertation der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilian-Universität München
21. Februar 2008

OÖGENESE IN HYDRA VULGARIS

Marsha Schade

Department Biologie II
Institut für Zoologie
Abteilung Zell- und Entwicklungsbiologie

MEINER KLEINEN FAMILIE

Ehrenwörtliche Erklärung:

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Ferner erkläre ich, dass ich weder versucht habe, eine Dissertation anderweitig einzureichen bzw. einer Prüfungskommission vorzulegen, noch eine Doktorprüfung durchzuführen. Die vorliegende Dissertation ist nicht ganz oder in wesentlichen Teilen einer anderen Prüfungskommission vorgelegt worden.

München, Februar 2008

Marsha Schade

Die vorliegende Arbeit wurde zwischen August 2002 und Februar 2008 unter Anleitung von PD Dr. Angelika Böttger und Prof. Dr. Charles N. David am Department Biologie II, Abteilung Zell- und Entwicklungsbiologie der Ludwig-Maximilian-Universität München durchgeführt.

Teile dieser Dissertation sind in folgenden Publikationen veröffentlicht:

David, C.N., Schmidt, N., Schade, M., Pauly, B., Alexandrova, O., Böttger, A. Hydra and the evolution of apoptosis. *Integr. Comp. Biol.* 2005 Aug; 45(4): 631-638.

Alexandrova, O., Schade, M., Böttger, A., David, C.N. Oogenesis in Hydra: nurse cells transfer cytoplasm directly to the growing oocyte. *Dev Biol.* 2005 May 1; 281(1): 91-101.

Erster Gutachter: PD Dr. Angelika Böttger

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Charles N. David

Tag der mündlichen Prüfung: 19. Juni 2008

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungen	6
--------------------	---

1. Einleitung

1.1. Oogenese	8
1.2. Gameten, Keimgranula und das Vasa Protein	11
1.3. Die Rolle der Apoptose während der Oogenese	14
1.4. Die Oogenese bei <i>Drosophila melanogaster</i>	16
1.5. Die Rolle der Keimgranula und des Vasa Proteins während der Oogenese von <i>Drosophila melanogaster</i>	20
1.6. Die Rolle der Apoptose während der Oogenese von <i>Drosophila melanogaster</i>	24
1.7. Die Oogenese bei <i>Caenorhabditis elegans</i>	27
1.8. Die Rolle der Keimgranula und des Vasa Proteins während der Oogenese von <i>Caenorhabditis elegans</i>	30
1.9. Die Rolle der Apoptose während der Oogenese von <i>Caenorhabditis elegans</i>	33
1.10. Die Oogenese bei <i>Hydra vulgaris</i>	36
1.11. Zielsetzung der Doktorarbeit	42

2. Ergebnisse

2.1. Induktion der Oogenese	43
2.2. Mini-Mazeration zur Isolierung von Eiflecken	44
2.3. Einteilung der Oogenesestadien	45
2.4. Zelltypen innerhalb des Eiflecks	47
2.4.1. Keimzelltypen	47
2.4.2. Differenzierungsstadien der Oozyten	49
2.5. Zellzusammensetzung des Eiflecks zu verschiedenen Stadien der Oogenese	52
2.6. DNA-Gehalt der Keimzellkerne	53
2.7. Markierungsindex	55
2.8. Fusion zwischen den Keimzellen und der Oozyte.....	58
2.9. Innerhalb eines Eiflecks kann es zunächst mehrere Oozyten geben	60
2.10. Zytoplasmatransfer zwischen den Keimzellen und der Oozyte	62
2.11. Apoptose der Keimzellen nach dem Zytoplasmatransfer	64
2.12. Auch Endodermzellen helfen bei der Phagozytose	67
2.13. Immunfärbung von weiblichen AEP Tieren	69
2.13.1. Lokalisation von 14-3-3 während der Oogenese mit Hilfe der Immunfärbung	69

2.13.2. Lokalisation von Vasa während der Oogenese

mit Hilfe der Immunfärbung	74
----------------------------------	----

3. Diskussion

3.1. Zelldifferenzierungs-Schema	79
3.2. Das Wachstum der Oozyte	81
3.3. Fusion von Oozyten	85
3.4. Apoptose der Keimzellen	86
3.5. Vergleich der Oogenese in <i>Hydra</i> , <i>Caenorhabditis</i> und <i>Drosophila</i>	88
3.6. Rolle der Epithelzellen während der Oogenese	90
3.7. Die Verteilung von <i>Hydra</i> 14-3-3 Proteinen in Keimzellen und Oozyten	91
3.8. Die Verteilung des Vasa Proteins in Keimzellen und Oozyten	93

4. Zusammenfassung und Ausblick	95
--	-----------

5. Material und Methoden

5.1. Material und Bezugsquellen

5.1.1. Chemikalien	97
5.1.2. Antikörper	99
5.1.2.1. Erstantikörper	99
5.1.2.2. Zweitantikörper	99
5.1.3. andere Farbreagenzien	100
5.1.4. Puffer und Lösungen	101
5.1.5. Medien	102
5.1.6. Kits	103
5.1.7. Sonstige Materialien	103
5.1.8. Mikroskope	104
5.1.9. Hydrakultur und Induktion der Oogenese	105

5.2. Immunhistochemie

5.2.1. Gelatine Objektträger	106
5.2.2. Mini-Mazeration	106

5.2.3.	Immunfärbung ganzer Hydren	107
5.2.4.	Mazeration und Immunfärbung von mazerierten Hydren	108
5.2.5.	TUNEL Test	109
5.2.6.	Membranfärbung mit dem Farbstoff FM 4-64	110
5.2.7.	Messung des DNA-Gehaltes	110
5.2.8.	BrdU Markierung von ganzen Tieren	111
5.2.9.	BrdU Markierung von Mazeraten	112
5.2.10.	konfokale Mikroskopie	113
 6. Literaturverzeichnis		115
 7. Publikationen		133
 8. Lebenslauf		134
 9. Danksagung		137

ABKÜRZUNGEN

BSA	Bovine Serum Albumin
BrdU	Brom-Desoxy-Uridin
°C	Grad Celsius
CaCl₂	Calciumchlorid
cm	Zentimeter
DAPI	4',6-Diamidin-2-Phenylindol
dH₂O/ddH₂O	einfach/doppelt destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EtOH	Ethanol
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Gramm
GFP	Green Fluorescent Protein
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HM	HM
KCl	Kaliumchlorid
KH₂PO₄	Kaliumhydrogenphosphat
l	Liter
M	Mol/Liter, molar
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
MgSO₄	Magnesiumsulfat
min	Minute
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mM	Millimolar, 10 ⁻³ molar
µM	Mikromolar
µm	Mikrometer, 10 ⁻⁶ Meter
mRNA	messenger-RNA
N	normal
NaCl	Natriumchlorid
Na₂CO₃	Natriumkarbonat
Na₂HPO₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaOH	Natronlauge
nm	Nanometer, 10 ⁻⁹ Meter
OH	Hydroxyl-Rest
PBS	Phosphate Buffered Saline
PFA	Paraformaldehyd
pH	negativer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration

RNAse	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
sek	Sekunde
SSC	Standard-Saline Citrat
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
ÜN	über Nacht
UTP	Uridin-Triphosphat

1. EINLEITUNG

1.1. Oogenese

Das Wort Oogenese kommt aus dem griechischen (von gr. *oon*, das Ei und gr. *genesis*, Entstehen, Werden) und bedeutet übersetzt „Eibildung“. Man versteht darunter die Entwicklung einer befruchtungsfähigen Eizelle aus einer Zelle der Keimbahn bei mehrzelligen Tieren.

Die Oogenese lässt sich in drei Phasen unterteilen. 1.) Vermehrungsphase: Zu Beginn der Oogenese entstehen durch vielfache Teilungen der Keimbahnzellen (Urkeimzellen) im Eierstock Oogonien. Diese vermehren sich ihrerseits weiter durch Mitose. 2.) Wachstumsphase: Es kommt zum Abschluss der Zellteilungen. Die Oogonien wachsen, häufig unter Einlagerung von Dottersubstanzen, zu primären Oozyten heran. Dann beginnt die Meiose und die Zelle wird über einen Zeitraum von einigen Tagen bis hin zu Jahren in der Prophase I der ersten Teilung angehalten. In vielen Tieren fördern Spermien die Wiederaufnahme der Meiose in zum Stillstand gebrachten Oozyten (Masui, 1985; McCarter et al., 1999).

Die nächste Phase der Oogenese nennt man 3.) die Reifungsphase. Die Reifung der Oozyte ist ein Ereignis im Zellzyklus, welches die Oozyten aus der meiotischen Prophase entlässt und ein Fortschreiten durch die meiotischen Teilungen und die Befruchtung erlaubt (Masui und Clarke, 1979; Wickramasinghe und Albertini, 1993; Downs, 1995). Das Hauptmerkmal dieser Phase ist das Zusammenbrechen der Kernhülle (NEBD für nuclear envelope breakdown oder GVBD für germinal vesicle breakdown). Während der Meiose I werden die sekundäre Oozyte, welche fast das gesamte Zytoplasma erhält, und das erste Polkörperchen gebildet (Abb. 1). Die haploide sekundäre Oozyte durchläuft die Meiose II und bildet das Ootid und ein weiteres Polkörperchen. Das erste Polkörperchen durchläuft auch die Meiose II und bildet zwei weitere Polkörperchen, so dass es jetzt insgesamt drei sind. Die Polkörperchen markieren den animalen Pol des Eis. Durch weitere Differenzierungsschritte wird das Ootid zum reifen Ei (Ovum).

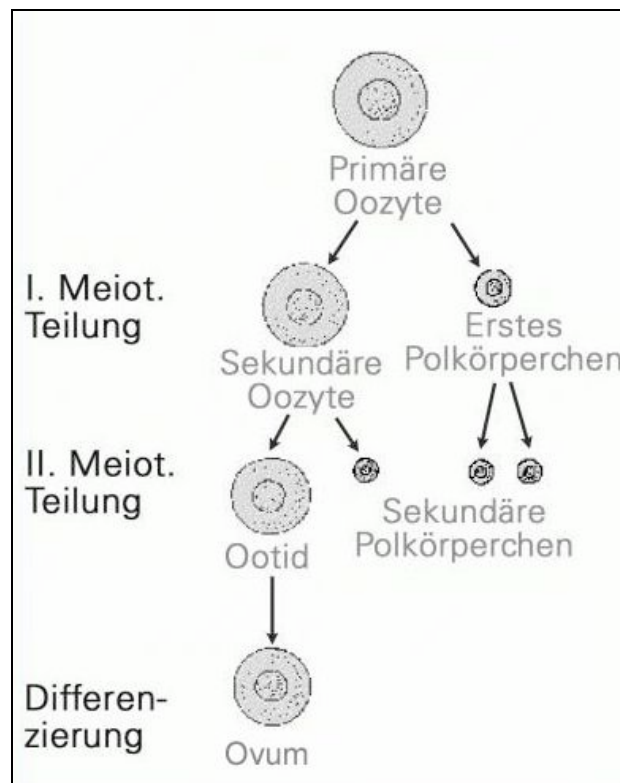


Abbildung 1: Aus Binkert (2006).

Meiose in der Oogenese.

Aus der primären Oozyte entstehen durch die erste meiotische Teilung die sekundäre Oozyte und das erste Polkörperchen. Nach der zweiten meiotischen Teilung wird aus der sekundären Oozyte das Ootid und ein sekundäres Polkörperchen. Aus dem ersten Polkörperchen sind durch die zweite meiotische Teilung zwei sekundäre Polkörperchen entstanden. Das Ootid differenziert weiter zum reifen Ei (Ovum).

Die Hauptaufgabe des Eis besteht in der Bereitstellung von Nährstoffen für den Embryo. Erreicht wird dies durch die Einlagerung von Dotter im Zytoplasma. Dotter besteht aus einem vielschichtigen Gemisch von Lipiden, Kohlenhydraten, Proteinen, Nukleinsäuren, Hormonen und anderen zum Aufbau des Embryos benötigten Substanzen. In bezug auf die Einlagerung von Reservestoffen unterscheidet man zwei Formen der Eibildung. Bei der solitären Eibildung nimmt die Eizelle Nährstoffe ohne Mithilfe anderer Zellen aus den umgebenden Körperflüssigkeiten auf, wohingegen bei der alimentären Eibildung Hilfszellen bei der Einlagerung von Reservestoffen beteiligt sind.

Das Ooplasma enthält auch einen großen Vorrat von RNA in Form von ribosomaler, messenger und transfer RNA. Diese RNA steuert die Synthese von Proteinen im frühen Embryo und hat einen maßgeblichen Einfluss auf den Ablauf der Entwicklung.

1.2. Gameten, Keimgranula und das Vasa Protein

Keimzellen (Gameten) geben genetisches Material von einer Generation an die nächste weiter. Sie sind sowohl totipotent als auch hochspezialisiert (Wylie, 1999). In vielen Organismen ist die Entwicklung der Keimzellen von spezialisierten Regionen im Zytoplasma des Embryos abhängig, dem sogenannten „germ plasm“ (Keimplasma). Das Keimplasma besitzt in bezug auf seine Morphologie und Ultrastruktur eine große Ähnlichkeit zur „nuage“. Bei Nuage handelt es sich um eine elektronenmikroskopisch sichtbare, verdichtete, fibrinöse Organelle (Eddy, 1975). Sie ist im perinukleären Zytoplasma lokalisiert und nicht von einer Membran umgeben (Abb. 2). Oft ist sie mit Zusammenballungen von Mitochondrien assoziiert und sie enthält RNA und Proteine (Saffman und Lasko, 1999). Man findet Nuage in allen Stadien der Keimzellen von der Urkeimzelle im Embryo bis hin zur Gamete adulter Gonaden.

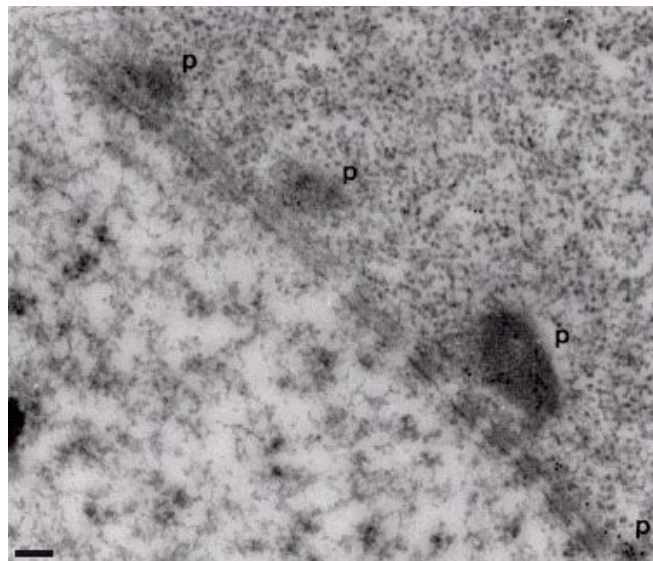


Abbildung 2: Aus Liang et al. (1994).

Elektronenmikroskopische Aufnahme von Dünnschnitten von *Drosophila* Ovarien. Gezeigt ist eine Nurse Zelle im Stadium 6 der Oogenese. Nuage (p) befindet sich auf der zytoplasmatischen Seite der Kernmembran. Maßstabsbalken 0.1 μm .

Keimplasma und Nuage sind ein artübergreifendes Merkmal von Keimzellen und werden seit Jahrzehnten als „Determinanten“ für die Keimlinie gehandelt (Saffman und Lasko, 1999). Es handelt sich offenbar um verwandte Strukturen und es wird vermutet, dass sie verschiedene Formen desselben Materials darstellen (Hay et al., 1988; Lasko und Ashburner, 1990).

Das Keimplasma unterscheidet sich von der „Nuage“ durch die Anwesenheit spezialisierter Organellen, der „germinal granules“ (Keimgranula). Ebenso wie Nuage sind Keimgranula nicht von einer Membran umgeben. Im Elektronenmikroskop sind sie als elektronendichte, fibröse Partikel zu erkennen (Abb. 3). Sie sind oft mit Mitochondrien assoziiert und enthalten viel RNA und Proteine. Bei der mRNA handelt es sich um maternale Faktoren, welche ausreichen, um die Keimbahnzellen zu bilden. Die enthaltenen Proteine sind in die Initiierung und Kontrolle der Translation sowie in den mRNA Abbau involviert. Alle bisher untersuchten Proteine in den Granula enthalten RNA Bindemotive.

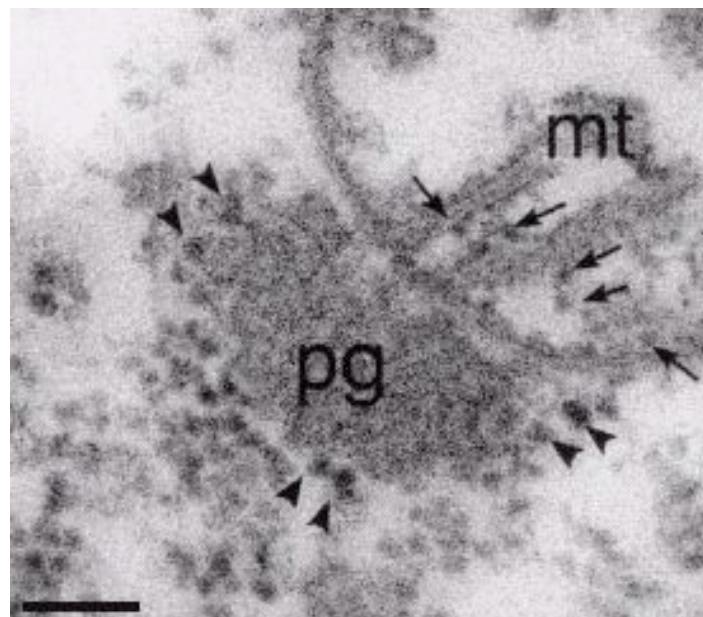


Abbildung 3: Aus Amikura et al. (2001).

Elektronenmikroskopische Aufnahme von Schnitten durch Polar Granula (pg) bei *Drosophila* Embryonen des Stadiums 1.

Die Polar Granula sind eng mit Mitochondrien (mt) assoziiert. Die Pfeile deuten auf Ribosomen innerhalb des Mitochondriums. Pfeilspitzen zeigen auf größere Ribosomen in der Nähe der Polar Granula. Maßstabsbalken 0.1 μ m.

Das Vasa-Protein ist sowohl eine Komponente des Keimplasmas als auch von Nuage. In allen bisher untersuchten Tieren befinden sich die mRNA oder die Produkte der vasa-verwandten Gene in Zellen der Keimbahn. Bei *Drosophila* (*vasa*), *C. elegans* (*glh-1*, *glh-2* und *glh-4*) und *Xenopus* (XVLG-1 Protein) spielen sie eine Rolle bei der Bildung und/oder der Erhaltung der Zellen der Keimlinie (Lasko and Ashburner 1988; Ikenishi und Tanaka 1997; Kuznicki et al. 2000).

Vasa ist eine ATP-abhängige DEAD-box-RNA-Helicase (Hay et al., 1988; Lasko und Ashburner, 1988). Die Helicase-Aktivität entwindet RNA. Dieser Prozess ist wichtig, weil die dreidimensional verworrene Struktur der RNA sonst die Translation vieler keimlinienspezifischer RNAs verhindern würde. Weiterhin ist Vasa in Splicing-Prozesse, RNA-Editierung, rRNA-Prozessierung, Kern-mRNA-Export und mRNA-Abbau involviert (Lüking et al. 1998).

1.3. Die Rolle der Apoptose während der Oogenese

Die Apoptose [auch programmierter Zelltod (programmed cell death, PCD)] ist ein hochkonservierter Prozess in vielzelligen Organismen, welcher eine allgemeine zelluläre Maschinerie und Morphologie beinhaltet. Sie ist in verschiedenste Prozesse von der Entwicklung des Embryos bis hin zur Aufrechterhaltung der Homöostase im Erwachsenen involviert, und sie spielt auch eine Rolle in der Keimbahn. Dabei wird die Apoptose während der normalen Entwicklung für die einwandfreie Bildung der Eier und Spermien gebraucht. Der Tod der Keimlinienzellen dient dazu, essentielle Proteine und anderes zelluläres Material von den Nährzellen an die wachsenden Gameten auszuliefern und überschüssiges Gewebe während der Differenzierung zu eliminieren (Mahajan-Miklos und Cooley, 1994; Gumienny et al., 1999; Technau et al., 2003; Arama et al., 2003). Zusätzlich kann es auch als Antwort auf bestimmte Kontrollpunkte zur Apoptose kommen, z.B. um die Zellzahl zu kontrollieren oder um gefährliche oder geschädigte Zellen zu eliminieren (Drummond-Barbosa und Spradling, 2001; Smith et al., 2002; Ashley, 2000).

Das Prinzip „Tod auszulösen, um Leben zu begünstigen“ wird während der Oogenese in vielen Invertebraten durch den Transport von Zytoplasma von den Nährzellen zur Oozyte umgesetzt. Die nachfolgende Apoptose der Nährzellen ist im Tierreich weit verbreitet und oft eine Voraussetzung für die einwandfreie Entwicklung der Oozyte (Matova and Cooley, 2001). Trotz der Anerkennung der Existenz von Apoptose während der Oogenese fängt man gerade erst an, die biologische Bedeutung der Apoptose während dieses Prozesses zu verstehen. Der Tod der Keimzellen zeigt oft charakteristische Kennzeichen der Apoptose, wie Fragmentierung der DNA, Kondensation des Chromatins, Ausstülpung der Membranen und die Aktivität von Caspasen. Trotzdem bleiben viele Aspekte der Maschinerie, welche in diesem Zelltod eine Rolle spielen, unklar. Der Signalweg beim Zelltod in den Keimzellen scheint sich in einigen Punkten sogar grundlegend von dem für die Apoptose in anderen Zelllinien zu unterscheiden. Einige Regulatoren die bei der Apoptose von somatischen Zellen wichtig sind (z.B. EGL-1 in *C. elegans* und *H99* Gene bei *Drosophila*), spielen bei der Apoptose von Keimzellen keine Rolle (Foley und Cooley, 1998; Gumienny et al. 1999).

Im Folgenden wird die Oogenese in drei Invertebraten-Modell-Organismen näher beschrieben. Zunächst werden ausgesuchte Aspekte der Eientwicklung bei *Drosophila* und *Caenorhabditis* erläutert. Abschließend wird ein Überblick über den bisherigen Wissensstand bei der Oogenese von *Hydra* gegeben.

1.4. Die Oogenese bei *Drosophila melanogaster*

Die Ovarien (Eierstöcke) von *Drosophila* bestehen jeweils aus mehreren büschelförmig zusammenhängenden Ovariolen (Abb. 4). Die Ovariolen münden in einen seitlichen Eileiter, die beiden seitlichen Eileiter vereinigen sich zu einem Eileiter. Über das Rezeptakulum seminis werden die Eier befruchtet und dann in die Gebärmutter geleitet. Nach der Befruchtung wird das Ei abgelegt und beginnt sofort mit der embryonalen Entwicklung. Jede Ovariole enthält viele Follikel (Eikammern) in unterschiedlichen Entwicklungsstadien. Einzelne Follikel entstehen am anterioren Ende der Ovariole und durchlaufen 14 Stadien der Entwicklung, während sie zum posterioren Ende wandern (King, 1970).

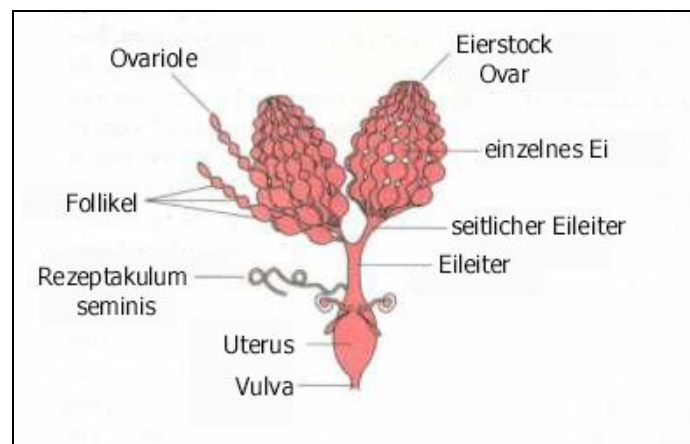


Abbildung 4: Aus

(<http://www.zum.de/Faecher/Materialien/hupfeld/index.htm?/Faecher/Materialien/hupfeld/Entwicklung/Drosophila/segmentierung.html>).

Aufbau der Eierstöcke von *Drosophila*.

Jede Ovariole besteht aus einem Germarium, in dem die Eizellen produziert werden, und einem Vitellarium zur Produktion der Dotterzellen. Das Germarium ist ein Fließband für neue Eikammern. Jeder Eierstock enthält mehr als ein Dutzend Germarien. Jedes Germarium wird in drei Regionen unterteilt (Abb. 5). In der Region 1 des Germariums befinden sich die Stammzellen der Keimlinie. Sie teilen sich und bilden jeweils eine Tochterstammzelle und eine Zystoblaste (Vorläufer des Eis). Die Zystoblaste durchläuft innerhalb der Region 2 vier Zyklen der Zellteilung, so dass eine Zyste mit 16 Keimzellen (Zystozyten) entsteht. In der Region 3 des Germariums wird die gesamte Zyste von einer einzelnen Lage von ca. 1000 somatischen Follikelzellen umhüllt. Damit ist die Bildung der Eikammer abgeschlossen und es kommt zur Abschnürung der Eikammer vom Germarium (Margolis und Spradling, 1995; Spradling et al., 1997). Die einzelnen Eikammern sind durch 6-8 Stielzellen voneinander getrennt.

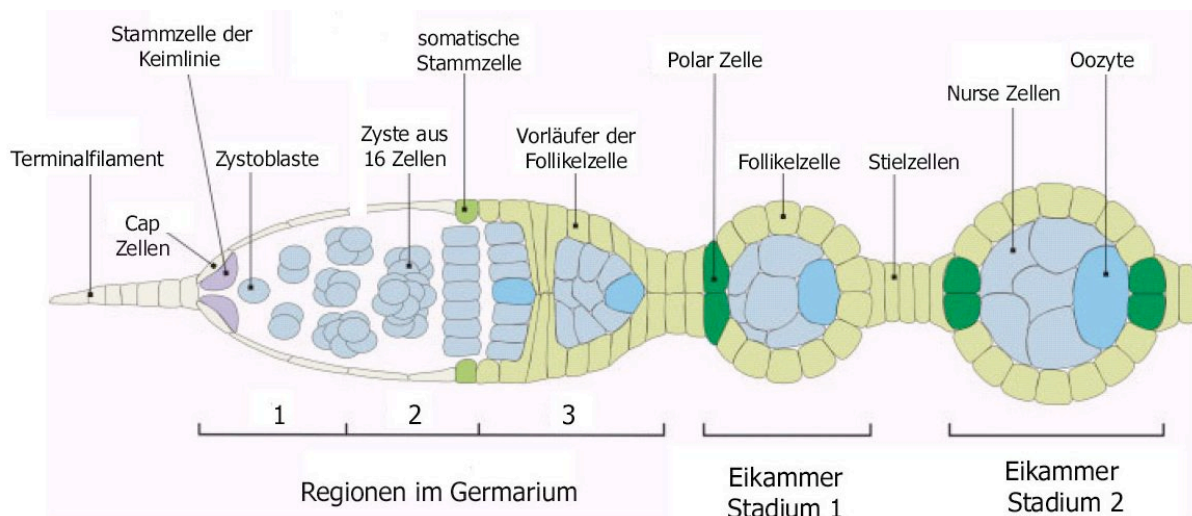


Abbildung 5: Aus Horne-Bardovinac und Bilder (2005).

Aufbau einer Eikammer.

Die Abbildung zeigt Ereignisse, die früh während der Oogenese stattfinden und zur Grundstruktur der Eikammer beitragen: Einkapselung der Zyste durch Vorläufer der Follikelzellen; Differenzierung von Polar- und Stielzellen; Posteriore Platzierung der Oozyte. Die große Vielfalt der Zelltypen innerhalb des Germariums und der Eikammer sind angedeutet.

Im Vitellarium reift die Eikammer, während sie zum posterioren Ende der Ovariole wandert. Eine einzelne Zystozyte entwickelt ein Mikrotubuli-Organisationszentrum (MTOC) und bildet ein polarisiertes Netzwerk von Mikrotubuli, welches sich über interzelluläre Brücken in alle 16 Zellen ausbreitet. Bei diesen Brücken handelt es sich um angehaltene Teilungsfurchen, welche bei *Drosophila* Ringkanäle genannt werden. Sie erhalten die Verbindung zwischen den Zellen in der Zyste aufrecht (Abb. 6).

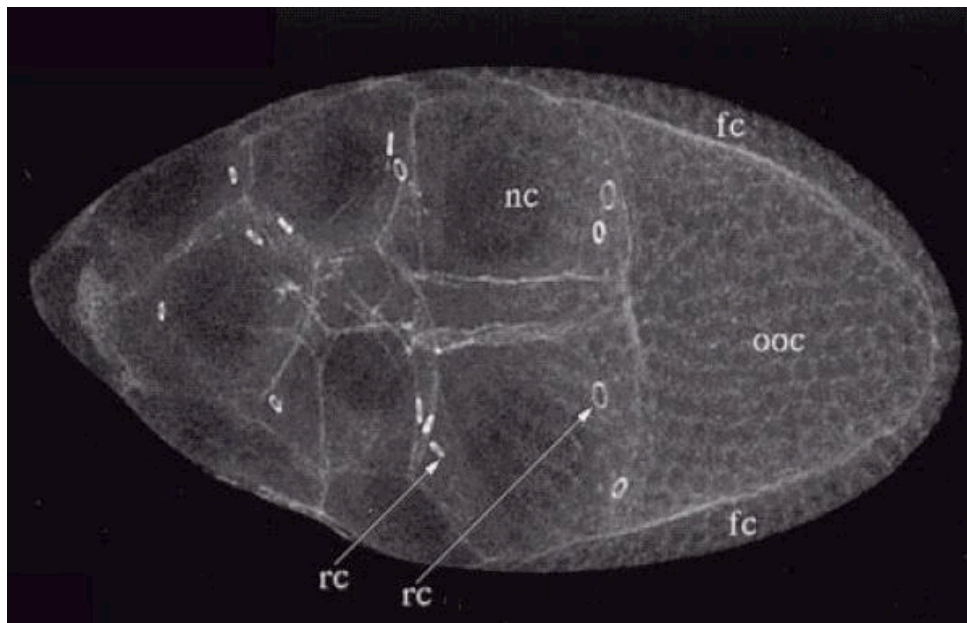


Abbildung 6: Aus Matova und Cooley (2001).

Die synzytiale Organisation von Keimzellen in *Drosophila*.

Die Keimlinienzyste von *Drosophila melanogaster* besteht aus einer Oozyte (ooc) und 15 Nährzellen (nc). Diese 16 Zellen sind über stabile interzelluläre Brücken, welche auch Ringkanäle genannt werden (rc), miteinander verbunden. Die Zyste wurde mit einem Antikörper gegen filamentöses Aktin gefärbt, welcher insbesondere die Ringkanäle deutlich markiert. (fc)=Follikelzellen.

Die Zelle, welche das MTOC besitzt, entwickelt sich zur Oozyte. Nur die Oozyte durchläuft die Meiose, während die anderen Zellen zu Nährzellen differenzieren. Das Genom der Nährzellen wird polyploid, ein Prozess in welchem die DNA repliziert wird, ohne dass es zur Zellteilung kommt. Die Polyploidie ermöglicht eine hohe Transkriptionsrate. Die Nährzellen bilden eine große Menge von Ribosomen, Proteinen und mRNA und versorgen damit die Oozyte, die selbst inaktiv ist.

Später ernähren auch die Follikelzellen die Oozyte. Sie liefern den Dotter, der aus Vitellogeninen (Lipoprotein) und Phosphovitinen (Phosphoprotein) besteht. Der Dotter wird im Fettkörper und im Ovar der Mutter hergestellt, in die Hämolymphe abgegeben, von den Follikelzellen aufgenommen und zur Oozyte weitergereicht. Über die Ringkanäle findet ein konstanter Strom von Zytoplasma und Organellen von den Nährzellen zur Oozyte hin statt. Auf diese Weise tragen die Nährzellen zum Wachstum der Oozyte bei. Nach dem Transfer des Zytoplasmas gehen die Zellen in die Apoptose und werden von Follikelzellen phagozytiert (Mahajan-Miklos und Cooley, 1994; Nezis et al., 2000).

Der gesamte Prozess der Oogenese dauert ca. eine Woche. Während dieser Zeit ist die Oozyte in der Prophase I der Meiose angehalten. Die Meiose läuft erst weiter, wenn das fertige Ei durch den Uterus wandert. Im frisch gelegten Ei wird die Meiose abgeschlossen.

1.5. Die Rolle der Keimgranula und des Vasa Proteins während der Oogenese von *Drosophila melanogaster*

Von der Mutter synthetisierte Komponenten des Keimplasmas, welches bei *Drosophila* Polplasma genannt wird, sammeln sich am posterioren Pol der Oozyte (Abb. 7). Während der ersten Stadien der Embryogenese finden nur Kernteilungen statt, so dass es sich um einen synzytialen Embryo handelt. Aus den ersten zehn Kernen, welche in das posteriore Polplasma gelangen, werden nach der Zellularisierung die Urkeimzellen (Santos und Lehmann, 2004). Sie werden von einer Membran umgeben und Polzellen genannt (Hüttner, 1923; Sonnenblick, 1941). Die Polzellen teilen sich asynchron und bilden um die 40 Zellen. Ein Teil dieser Zellen wandert später in die Eierstöcke des Tieres und wird dort zu den Urkeimzellen (Kobayashi et al., 1993), aus denen sich die Gameten entwickeln.

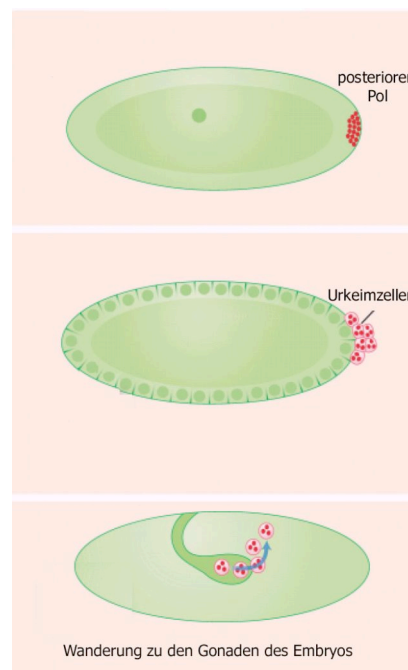


Abbildung 7: Aus Strome et al. (2007).

Bildung der Urkeimzellen in *Drosophila*.

Das Polplasma ist in roten Granula dargestellt. Der blaue Pfeil in der untersten Reihe zeigt die Wanderungsrichtung der Keimzellen. Das Polplasma bildet sich am posterioren Pol der Oozyte und legt fest, wo sich die Urkeimzellen, oder Polzellen, im Embryo bilden werden. Die Polzellen entstehen im synzytialen Embryo, nachdem sich die Kerne geteilt haben und zur Peripherie gewandert sind. Posteriore Kerne gelangen in das Polplasma und knospen aus, um Polzellen zu bilden, bevor die somatischen Kerne zellularisieren.

Die Zellularisierung der Polzellen hängt vom Polplasma ab (Mahowald, 1962), in welchem sich auch die Keimgranula befinden. Sie werden bei *Drosophila* „Polar Granula“ genannt. Das Polplasma enthält die Faktoren, welche notwendig und ausreichend sind, um die Bildung der Keimzellen während der frühen Embryogenese herbeizuführen (Illmensee und Mahowald, 1974). Das *oskar* Gen spielt eine entscheidende Rolle bei der Bildung des Polplasmas. Die Akkumulation und anschließende Translation der *oskar* mRNA am posterioren Pol der Oozyte löst eine Kaskade von nachgeschalteten Ereignissen aus, welche mit der Bildung des Polplasmas enden (Styhler et al., 2002).

Die Komponenten des Polplasmas sind fortlaufend in der Keimlinie vorhanden (Mahowald 1971; Hay et al., 1988a). Während der späten Oogenese und der frühen Embryogenese befinden sich die Polar Granula am posterioren Pol. Sie sind in großen Ansammlungen organisiert, welche oft mit Mitochondrien assoziiert sind. Zum Zeitpunkt der Blastodermbildung, werden sie in die Polzellen abgesondert. Dort vereinigen sie sich zu einer kleineren Zahl von größeren Partikeln (Mahowald, 1968), verschwinden plötzlich und werden von Nuage ersetzt (Mahowald, 1971). Nuage umgibt die zytoplasmatische Seite der Kernhülle und kann auch mit Kernporen assoziiert sein (Mahowald, 1971a; Allis et al., 1979).

Mit der Bildung der Polzellen erscheint neben den Polar Granula eine weitere elektronendichte Struktur, welche „nuclear bodies“ genannt wird (Mahowald et al., 1976), und sich in den Kernen der Polzellen befindet (Mahowald 1971; Hay et al., 1998a). Die nuclear bodies verschwinden wie die Polar Granula in der Mitte der Embryogenese (Mahowald 1971), erscheinen dann jedoch wieder in den Kernen der Nährzellen.

Das Vasa Protein ist während der gesamten Entwicklung in den weiblichen *Drosophila* Keimzellen vorhanden. Innerhalb der Nährzellen findet man es am auffälligsten in Nuage, aber auch im Zytoplasma und im Kern. Während des Stadiums 8 wird es von den Nährzellen in die Oozyte transportiert. Im Stadium 10a hat sich das Protein deutlich am posterioren Pol der Oozyte angereichert.

Es ist jedoch in geringeren Konzentrationen im gesamten Zytoplasma der Oozyte zu finden, nicht jedoch im Oozytenkern oder um den Oozytenkern herum (Lasko und Ashburner, 1990). Nach der Befruchtung findet man das Vasa Protein innerhalb des Polplasmas der Polzellen in den Polar Granula (Hay et al., 1988). Dort verbleibt es und gelangt später in die Gonaden (Lasko und Ashburner, 1990).

Die molekulare Funktion von Vasa liegt in der Bindung von Ziel mRNAs und in der Regulation ihrer Translation (Dahanukar und Wharton, 1996; Styhler et al., 1998). Vasa interagiert sowohl mit mRNAs, welche in die Etablierung der Keimzellen involviert sind, wie z.B. *nanos* und *oskar* (Markussen et al., 1995; Rongo et al., 1995; Gavis et al., 1996), aber auch mit mRNAs, welche an der Oogenese beteiligt sind, wie z.B. *gurken* (Tomancak et al., 1998).

Während der Oogenese ist das Vasa Protein in eine ganze Reihe von verschiedenen Prozessen einbezogen. So wirkt es über die Regulierung der *gurken* Expression an der Etablierung der A/P und D/V Polarität der Oozyte mit (Tomancak et al., 1998). Weiterhin spielt es eine Rolle bei der Einkapselung der Oozyte durch die Follikelzellen, bei der Positionierung der Oozyte innerhalb der Eikammer, bei der Integrität des Oozytenkerns und bei der Beendigung der Oogenese (Tomancak et al., 1998). Vasa wird auch für den Transport von mehreren mRNAs von den Nährzellen zur Oozyte benötigt. Die transportierten mRNAs spielen dann bei der Musterbildung innerhalb der Oozyte eine Rolle (Styhler et al., 1998). Das Gen ist außerdem in das Wachstum der Keimlinienzyste involviert. Dabei kontrolliert es die Teilung der Zystozyten (Styhler et al., 1998) und beeinflusst darüber die Proliferation der Keimlinie.

Während der Embryogenese hat das Vasa Protein zwei wichtige Aufgaben. Zunächst spielt es eine Rolle bei der Bildung der Keimzellen. Es wird dabei am posterioren Pol der Oozyte für die Bildung des Polplasmas benötigt (Hay et al., 1988a; Hay et al., 1990; Lasko und Ashburner, 1990; Liang et al., 1994). Die posteriore Akkumulation von Vasa wird dabei über seine Interaktion mit dem Oskar Protein vermittelt (Breitwieser et al., 1996). Später dann beeinflusst es die Ausbildung des Abdomens (Schüpbach und Wieschaus, 1986) über die Translation der *nanos* mRNA.

Sowohl die Aktivität von Oskar, als auch die von Vasa sind notwendig für die Lokalisation der *nanos* mRNA am posterioren Pol der Oozyte (Liang et al., 1994). Vasa agiert dabei upstream von *nanos* (Lehmann und Nüsslein-Vollhard, 1991). Seine Funktion ist es, den hemmenden Effekt des translationalen Kontrollelements von *nanos* zu überwinden. Dieses Element unterdrückt die Translation der *nanos* mRNA (Gavis et al., 1996).

1.6. Die Rolle der Apoptose während der Oogenese von *Drosophila melanogaster*

Zu späten Stadien der *Drosophila* Oogenese ist ein entwicklungsbedingter Zelltod für die Entfernung der Nährzellen verantwortlich, nachdem diese ihre Aufgabe, die Oozyte mit Nährstoffen zu versorgen, erfüllt haben. Dieser Zelltod ist für die weitere normale Entwicklung einer jeden Oozyte notwendig.

Zum Ende der Oogenese (Stadium 10B) finden mehrere Ereignisse statt, welche auf den Beginn eines apoptotischen Signalweges hinweisen. Die Nährzellen durchlaufen Veränderungen ihres Aktin Zytoskeletts (Gutzeit, 1986; Cooley et al., 1992), sie runden sich ab (Okada und Waddington, 1959) und ihre Kernmembran wird permeabel (Okada und Waddington, 1959; Giorgi und Deri, 1976; Cooley et al., 1992). Nach diesen Ereignissen wird der Hauptteil des Nurse-Zell-Zytoplasmas innerhalb von 30 Minuten in die Oozyte transportiert (Mahajan-Miklos und Cooley, 1994a). Danach zeigen die Kerne der Nährzellen kondensiertes Chromatin und fragmentierte DNA, wie es typisch ist für apoptotische Zellen (Cavaliere et al., 1998; Foley und Cooley, 1998; McCall und Steller, 1998). Die Überreste der Nährzellen werden von den Follikelzellen phagozytiert (Cummings und King, 1970; Nezis et al., 2000).

Der Tod der Nährzellen wird allerdings auch von mehreren zellulären Ereignissen begleitet, welche man bei der Apoptose von somatischen Zellen nicht beobachten kann: die Bildung von Aktin-Bündeln in den Nährzellen (Gutzeit, 1986), das Einbringen des Zytoplasmas der Nährzellen in die Oozyte und das Überleben der Oozyte, während die mit ihr verbundenen Schwestern alle sterben.

Der programmierte Zelltod der Nährzellen zeigt außerdem auf molekularer Ebene deutliche Unterschiede verglichen mit dem Zelltod in anderen *Drosophila* Geweben (Abb. 8):

Die drei pro-apoptotischen Gene *reaper*, *hid* und *grim*, welche den Caspase Inhibitor Diap1 bei dem Hauptteil der Apoptosen während der *Drosophila* Entwicklung binden und inaktivieren, werden bei dem Zelltod der Nährzellen nicht gebraucht (Cashio et al., 2005; Foley und Cooley, 1998; Kornbluth und White, 2005; Ryoo et al., 2002). Auch die Mutation von alternativen Aktivatoren wie *eiger* und *debcl* hat keinen Effekt auf den Tod der Nährzellen (Peterson et al., 2007).

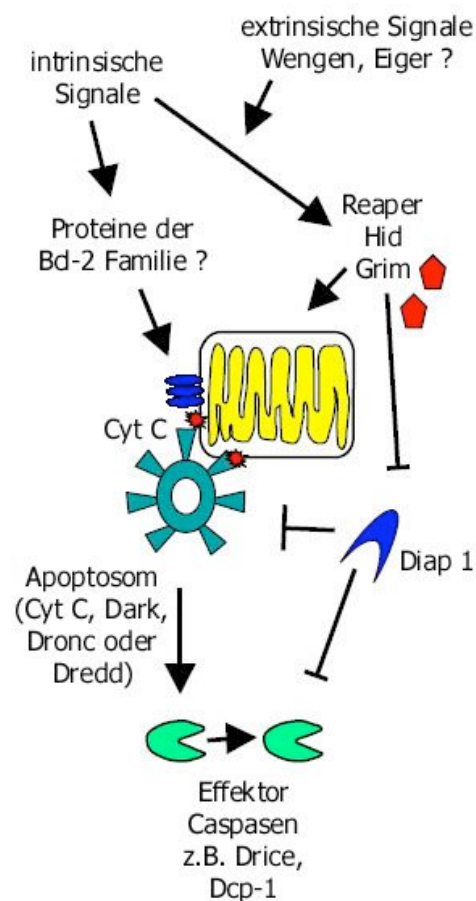


Abbildung 8: Verändert aus McCall (2004).

Modell der Apoptose in *Drosophila*.

Eiger ist ein Aktivator der Apoptose in *Drosophila*. Es handelt sich um einen Liganden der TNF Familie, welcher oberhalb von apoptotischen Aktivatoren über Wengen, den *Drosophila* Todesrezeptor, signalisiert (Igaki et al., 2002; Kanda et al., 2002; Kauppila et al., 2003; Moreno et al., 2002). Eiger induziert den Zelltod über die Aktivierung des JNK Signalweges (Igaki et al., 2002; Kauppila et al., 2003; Moreno et al., 2002). Dark (Apaf-1/Ced-4 Homolog) fördert die Aktivität von Caspasen (Kanuka et al., 1999; Rodriguez et al., 2002; Zhou et al., 1999).

Diap1 (*Drosophila* inhibitor of apoptosis) inhibiert Caspasen durch direkte Bindung oder durch seine Funktion als E3-Ubiquitin-Ligase, womit er Caspasen für die Ubiquitinierung und den Abbau markiert (Chai et al., 2003; Ditzel et al., 2003; Wilson et al., 2002; Yan et al., 2004). Seine Überexpression kann den Tod der Nährzellen jedoch nicht verhindern (Peterson et al., 2003; Mezzalupo et al., 2006). Dies deutet darauf hin, dass der Tod der Nährzellen Caspase-unabhängig sein könnte. Diese Vermutung wird von der Tatsache unterstützt, dass weder die Mutation der Effektor Caspasen Dcp-1, Drice oder Damm noch die der Initiator-Caspasen Dredd (Homologie zu Caspase-8), Strica oder Dronc (Homologie zu Caspase 9) einen Einfluss auf die Apoptose hat (Baum et al., 2005; Foley und Cooley, 1998; Laundrie et al., 2003; Peterson et al., 2003). In den neuesten Studien von Baum et al. (2007) konnte mit Hilfe von Doppelmutationen jedoch auch gezeigt werden, dass die Caspasen Strica und Dronc sowie Dcp-1 und Drice jeweils redundante Funktionen beim Tod der Nährzellen haben und somit eventuell doch eine Rolle beim Tod der Nährzellen spielen.

Die Rolle von Cytochrom C bei der somatischen Apoptose in *Drosophila* ist unklar, die meisten Darstellungen gehen jedoch davon aus, dass es nicht von den Mitochondrien freigesetzt wird (Dorstyn et al., 2002; Kanuka et al., 1999; Kornbluth und White, 2005; Varkey et al., 1999; Zimmerman et al., 2002). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass ein Antikörper gegen Cytochrom C spezifisch Nährzellen färbt (Peterson et al., 2003; Varkey et al., 1999). Die Signalgebung über die Mitochondrien könnte also beim Tod der Nährzellen eine Rolle spielen (Rodriguez et al., 2002).

1.7. Die Oogenese bei *Caenorhabditis elegans*

C. elegans ist ein selbstbefruchtender Hermaphrodit. Er produziert früh während der Gametogenese Spermien, bevor er als Erwachsener zur Oogenese wechselt.

Die Keimlinie von *C. elegans* proliferiert von einer Ur-Keimzelle (PGC, primordial germ cell), welche im frühen Embryo festgelegt wird, zu mehreren tausend Zellen im erwachsenen Tier.

Das meiste der *C. elegans* Gonade ist ein Synzytium (Abb. 9). Acht bis zwölf Kerne sind um einen zytoplasmatischen inneren Bereich herum angeordnet, welcher Rachis genannt wird. Jeder Kern ist von Zytoplasma und einer unvollständigen Plasmamembran umgeben, weshalb diese Kerne auch als Keim"zellen" bezeichnet werden. Zur Rachis hin gibt es allerdings keine Plasmamembran. Die Keimzellen übernehmen die Funktion von Nährzellen, da das Zytoplasma, welches sie zu dem Synzytium beisteuern, von den sich entwickelnden Oozyten aufgenommen wird. Die Nährzellen sind morphologisch nicht von den Oozyten zu unterscheiden. Es handelt sich bei den Nährzellen um meiotische Keimzellkerne, welche transkriptionell hoch aktiv sind. Nach dem Erreichen des Pachytän zellularisiert etwa die Hälfte der Keimzellkerne, geht in die Apoptose und wird von Mantelzellen der umgebenden Gonade phagozytiert (Gumienny et al., 1999).

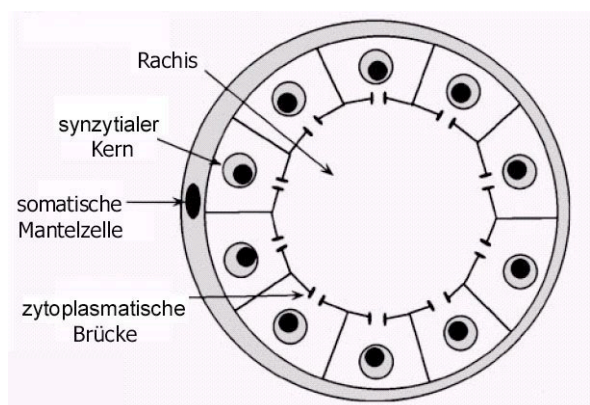


Abbildung 9: Verändert aus Gumienny et al. (1999).

Schematischer Querschnitt durch den distalen Arm der Gonade eines erwachsenen *C. elegans* Hermaphroditen.

Die Keimlinie ist von somatischen Mantelzellen umgeben. Die synzytialen Keimzellkerne befinden sich an der Peripherie der Gonade und sind bis auf eine Seite, welche zur Rachis hin offen ist, von Membranen umgeben.

Die Gonade von *C. elegans* besteht aus zwei symmetrischen, U-förmigen Eileitern, welche beide über eine Spermathek mit der gemeinsamen Gebärmutter verbunden sind (Abb. 10).

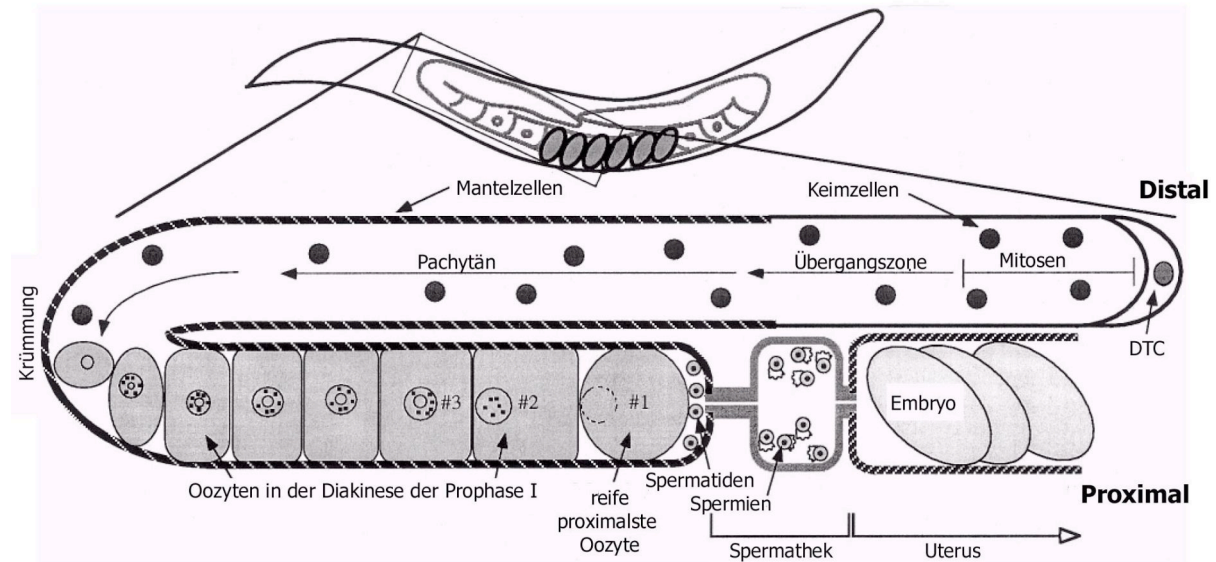


Abbildung 10: Aus McCarter et al. (1999).

Aufbau der *C. elegans* Gonade.

In beiden U-förmigen Eileitern werden weibliche und männliche Gameten gebildet. Die Keimzellen proliferieren am distalen Ende. Während sie weiter proximal wandern, beginnen sie in der Übergangszone mit der meiotischen Prophase. (Weitere Details vergleiche Text.)

In bezug auf die Entwicklung der Keimlinie besitzt die Gonade eine Polarität. Distal proliferieren die mitotischen Zellen während sich proximal die differenzierenden Gameten befinden. Die mitotische Region beinhaltet die Stammzellen der Keimlinie, welche sich selbst erneuern und differenzierende Gameten ausbilden. Die mitotischen Teilungen der Keimlinie werden durch die somatische „distal tip cell“ (DTC) kontrolliert, welche den Notch-Signalweg benutzt, um Mitose zu fördern und Meiose zu unterdrücken (Kimble und White 1981; Schedl, 1997).

Sobald die Keimzellen die sogenannte Übergangszone erreicht haben, starten sie mit der Meiose und durchlaufen das Pachytän-Stadium der meiotischen Prophase und die Gametogenese, während sie sich weiter proximal bewegen (Schedl, 1997; Dernburg, 1998). Das Pachytän-Stadium durchlaufen sie sehr langsam, da zu diesem Zeitpunkt die zytoplasmatischen Bestandteile der Oozyte synthetisiert werden. In der Nähe der Krümmung des Eileiters verlassen die Zellen das Pachytän als Antwort auf die Aktivierung des ras/MAPK-Signalweges und beginnen mit dem Wachstum. Sie werden jetzt nach und nach immer mehr von einer Plasmamembran eingeschlossen. Im proximalen Arm gehen die Keimzellen weiter zur Diakinese der Prophase I und vergrößern sich, um Oozyten zu bilden, während sie in einer Reihe in die Gebärmutter einwandern. Wenn die am meisten proximal gelegene Oozyte ihre Differenzierung beendet, schnürt sie sich vom Synzytium ab und wird in die Spermathek abgeschnürt, wo sie befruchtet wird. Beim Eisprung wird in den Oozyten das Beenden der Meiose durch eine Interaktion mit den Spermien ausgelöst. Wenn die Oozyte mit einem Spermium fusioniert, setzt sie die Meiose fort und durchläuft die zwei Runden der meiotischen Zellteilungen.

In jungen erwachsenen Hermaphroditen wiederholt sich der Reifungs-Eisprungs-Befruchtungszyklus ca. alle 23 Minuten in jedem Arm des Eileiters (McCarter et al., 1999).

1.8. Die Rolle der Keimgranula und des Vasa Proteins während der Oogenese von *Caenorhabditis elegans*

Bei dem Nematoden *C.elegans* werden die Keimgranula P-Granula genannt (Strome und Wood, 1982; Wolf et al., 1983). Sie werden von der Mutter in die Oozyte abgegeben. In der reifen Oozyte sind die P-Granula im gesamten Zytoplasma verteilt (Abb. 11, rechts). Nach der Befruchtung wandern sie zum posterioren Ende und gelangen so in die P-Keimlinie des frühen Embryo. Sie befinden sich in der Zygote in der Keimlinienvorläuferzelle „P₀“ (Strome und Wood, 1983; Wolf et., 1983) und werden stufenweise auf die im Folgenden durch asymmetrische Teilungen entstehenden Zellen „P₁, P₂, P₃“ und letztlich auf die Urkeimzelle „P₄“ aufgeteilt (Abb.11, links). Dies geschieht über eine Kombination von Mechanismen (Hird et al., 1996; Cheeks et al., 2004): 1) posteriore Bewegung mit dem Hauptteil der zytoplasmatischen Strömung, 2) wandern mit dem Kern zur zukünftigen Keimlinienseite der Zelle, 3) Destabilisierung der Granula, welche im Zytoplasma der somatischen Tochterzellen zurückbleiben. Diese Mechanismen führen zur Absonderung der meisten Granula in die Urkeimzelle P₄. Befinden sich die Granula einmal in der P₄, lokalisieren sie sich hauptsächlich um die Außenseite der Kernhülle, wo sie auch während der restlichen Entwicklung der Keimlinie bleiben. Sie umgeben jeden Keimzellkern während der mitotischen Proliferation und der Gametogenese. Die P₄ Zelle teilt sich während der Embryogenese einmal. Es entstehen die Zellen Z2 und Z3, welche sich erst nach dem Schlüpfen weiter entwickeln (Sulston et al., 1983). Beim Schlüpfen besteht der Eierstock aus diesen zwei Urkeimzellen und den beiden somatischen Vorläuferzellen (Z1 und Z4) und einer sie umgebenden Membran. Nach dem Schlüpfen teilen sich Z2 und Z3 und bilden insgesamt ca. 2000 Keimzellen. P-Granula befinden sich in allen Nachkommen der P₄ außer in den reifen Spermien.

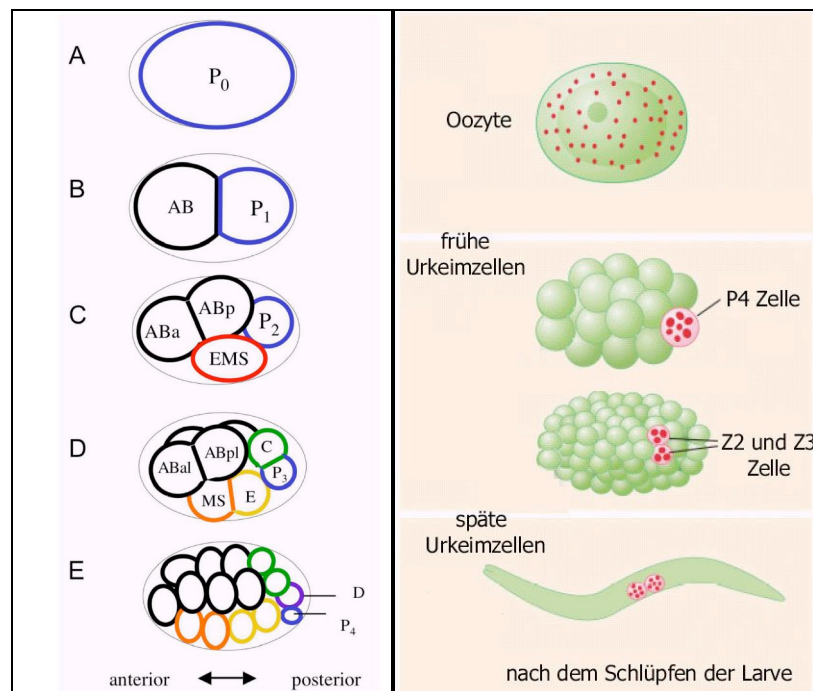


Abbildung 11, links: Aus Gönczy und Rose (2005).

Bildung der Gründerzellen im frühen Embryo.

In *C. elegans* Embryonen entstehen durch 5 asymmetrische Teilungen sechs Gründerzellen: AB, MS, E, C, D und P₄. Die erste asymmetrische Teilung unterteilt die Zygote in die größere anteriore Blastomere AB und die kleinere posteriore Blastomere P₁. Anschließend teilt sich P₁ in EMS und P₂. Weitere asymmetrische Teilungen von EMS in MS und E, von P₂ in C und P₃ und dann von P₃ in D und P₄, komplettiert die Bildung der sechs Gründerzellen, deren Nachkommen jeweils verschiedene Untergruppen von Zelltypen produzieren. Die Vorläufer der Keimlinie (P-Zellen) sind blau umrandet.

Abbildung 11, rechts: Aus Strome et al. (2007).

Zusammenfassung der frühen Entwicklung der Keimlinie in *C. elegans*.

Im frühen Embryo wird die Keimlinie von der somatischen Zelllinie durch eine Reihe von ungleichen Teilungen getrennt. P-Granula sind zunächst gleichmäßig im Zytoplasma der Zygote verteilt. Während der Teilungen lokalisieren sie posterior und gelangen bei jeder Teilung nur in die Blastomere der Keimlinie. Die Urkeimzelle P₄ teilt sich während der Embryogenese nur einmal und bildet Z₂ und Z₃, die Begründer der erwachsenen Keimlinie.

P-Granula enthalten RNA und zahlreiche Proteine. Von allen denkt man, dass sie RNA binden und einige werden mit translationeller Kontrolle in Verbindung gebracht. P-Granula binden maternale Proteine und RNAs und bringen sie zu den Zellen der Keimlinie. Sind diese einmal dort angekommen, befinden sie sich in der Nähe des Kerns und sind mit Clustern von Kernporen assoziiert (Pitt et al., 2000).

Sogar P-Granula, welche sich von der Kernhülle lösen, enthalten Kernporenproteine und porenähnliche Strukturen. Daher könnten viele oder die meisten über die Entwicklung regulierten maternalen mRNAs die P-Granula durchlaufen und vorübergehend in ihnen festgehalten werden, wenn sie den Kern verlassen. So könnten die Keimgranula neue Transkripte regulieren, sobald diese den Kern verlassen.

Proteine der GLH-Familie (germ like helicase) sind die *C. elegans*-Pendents der Vasa-DEAD-box-Helicasen und werden GLH-1 bis GLH-4 genannt (Gruidl et al., 1996; Kuznicki et al., 2000; Roussell und Bennett, 1993). Zu allen Stadien der Keimzellentwicklung enthalten die P-Granula alle vier GLH`s. Einhergehend mit der Lokalisation in den P-Granula sind die GLH`s in den Oozyten und im Embryo zytoplasmatisch, während sie zu allen späteren Entwicklungsstadien und in den distalen und medialen Regionen der Gonade perinukleär sind. Sie spielen eine Rolle bei der postembryonalen Entwicklung der Gonade und werden für die normale Entwicklung der Keimlinie benötigt (Kuznicki et al., 2000). GLH-1 und GLH-2 sind dabei kritisch für die normale Proliferation der Keimlinie (Gruidl et al., 1996). Die Aktivität von GLH-1 und GLH-2 spielt auch eine Rolle bei der Morphologie der P-Granula und bei der Lokalisation von verschiedenen Proteinen in den P-Granula. (Kawasaki et al., 1998; Kawasaki et al., 2004; Kuznicki et al., 2000; Schisa et al., 2001). Defekte in GLH-1/-4 Zellen führen dazu, dass die Zellen das Pachytän nicht verlassen können (Kuznicki et al., 2000).

Weiterhin werden GLH`s für den Transport der mRNA weg von den Keimzellkernen gebraucht (Schisa et al., 2001). Alle haben N-terminal sogenannte „FG-Wiederholungen“. Solche Wiederholungen findet man normalerweise in Nukleoporinen (Kernporenproteinen). Sie dienen als Bindestelle der Kernpore für Transportfaktoren. mRNA Exportfaktoren in der Gonade könnten auf diese Art und Weise mit den GLH-Proteinen interagieren. Die Interaktion könnte exportierten Komplexen das Wegwandern von den Kernen erlauben.

1.9. Die Rolle der Apoptose während der Oogenese von *Caenorhabditis elegans*

Im Gegensatz zu Säugetieren und *Drosophila* besitzt *C. elegans* keine morphologisch eindeutig unterscheidbaren Nährzellen. Diese Funktion wird von frühen meiotischen Keimzellen übernommen, welche auf einer hohen Ebene transkriptionell aktiv sind (Starck, 1977). Transkripte, welche von diesen Zellen gemacht werden, werden in das gemeinsame zytoplasmatische Mark exportiert und danach von den reifenden Oozyten aufgenommen (Gibert et al., 1984). Bei *C. elegans* sind die Nährzellen gleichzeitig Vorläufer der Gameten, daher gibt es viel mehr Kandidaten für Oozytenkerne als durch das vorhandene Zytoplasma untergebracht werden können. *C. elegans* scheint Apoptose zu benutzen, um dieses Problem zu lösen (Gumienny et al., 1999). In normalen erwachsenen Hermaphroditen sterben über die Hälfte aller potentiellen Oozyten während der meiotischen Reifung. Sobald die Keimzellen ihre Funktion als Nährzellen erfüllt haben, werden überschüssige Kerne eliminiert, so dass die Anzahl der Oozytenvorläufer, welche überleben und differenzieren der Menge an vorhandenem Zytoplasma entspricht.

Die Keimzellen benutzen zunächst den gleichen Apoptoseapparat wie die 131 somatischen Zellen (Abb. 12). Die Apoptose wird durch die Genprodukte CED-3 und CED-4 vermittelt (Ellis und Horvitz, 1986). CED-4 ist ein Adapterprotein, das ATP benötigt und mit CED-3 ein sogenanntes „Apoptosom“ bildet (Hengartner, 1997). Die Bildung des Apoptosoms führt zur Konzentration von CED-3-Zymogenen, wodurch die Autoprozessierung von CED-3 begünstigt wird. Dies führt schließlich zur Bildung aktiver CED-3-Dimere. In gesunden Zellen hemmt der in den Mitochondrien lokalisierte anti-apoptotische Faktor CED-9 das pro-apoptotische Molekül CED-4 und verhindert so die Bildung des Apoptosoms (Spector et al., 1997).

Bei einem Todesstimulus findet in den somatischen Zellen eine transkriptionelle Aktivierung des Todesfaktors EGL-1 statt, welcher an CED-9 bindet und es damit inaktiviert (Conradt und Horvitz, 1998). Dies wiederum führt zur Aktivierung von CED-4, welches mit der Procaspase CED-3 das Apoptosom bildet. Es kommt zur Autoprozessierung von CED-3 und zur Apoptose.

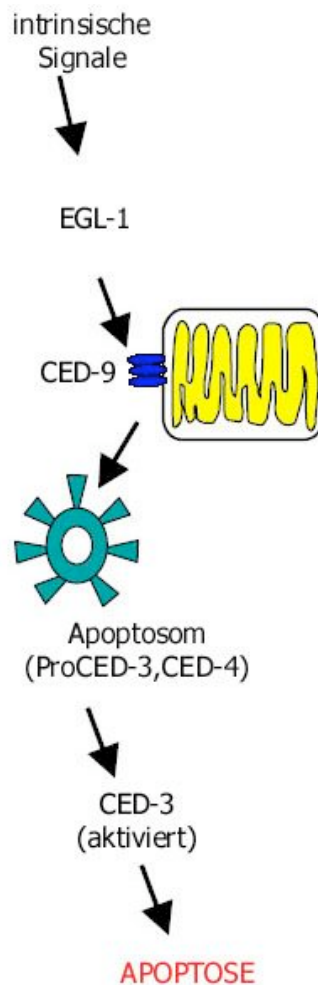


Abbildung 12: Verändert aus McCall (2004).

Modell der Apoptose in *C. elegans*.

Egl-1 und Ced-9 sind Mitglieder der Bcl-2 Familie von pro- und anti-apoptotischen Regulatoren. Ced-3 ist ein Mitglied der Caspase Familie und bei Ced-4 handelt es sich um ein Adaptermolekül, welches die Aktivierung von Caspasen erleichtert.

EGL-1 spielt beim Tod der Nährzellen keine Rolle. Außerdem wird die Aktivierung der Apoptosemaschinerie in Körperzellen und Keimzellen unterschiedlich reguliert. Der Tod der Keimzellen braucht die Aktivierung des ras/MAPK-Signalweges. Der Keimzelltod wird nur zu einem spezifischen Stadium der Oogenese beobachtet: kurz bevor die Keimzellen das Pachytän-Stadium der Prophase I verlassen. Wird die ras/MAPK-Signalkaskade inaktiviert, können die Zellen das arretierte Pachytän nicht verlassen (Church et al., 1995) und auch der Keimzelltod wird so verhindert (Gumienny et al., 1999).

Des weiteren ist bekannt, dass die RNA-Helicase *cgh-1* für das Überleben der Oozyten gebraucht wird (Navarro et al., 2001).

Eine Studie von Lettre et al. (2004) hat mit Hilfe von RNAi 21 Gene identifizieren können, welche an der Regulation des Keimzelltodes beteiligt sind. Die Gene werden *gla* (germline apoptosis)-Gene genannt und ihr „knock-down“ führt zu einer vermehrten Apoptose innerhalb der Keimlinie. Bei sechzehn dieser Gene konnte nachgewiesen werden, dass sie den Keimzelltod indirekt induzieren. Dies geschieht über die Aktivierung von p53-abhängigen Qualitätskontrollmechanismen, welche normalerweise als Antwort auf DNA-Schädigung aktiviert werden (Lettre et al., 2004). Zumindest einige der *gla*-Gene sind in die Aufrechterhaltung der Stabilität des Genoms involviert. *Rad-50* und *rad-51* spielen eine Rolle bei der DNA-Reparatur und der meiotischen Rekombination, während *gst-5* einen Schutz vor reaktiven Sauerstoff-Spezies gewährleistet. Des weiteren konnte *ape-1* identifiziert werden, das *C. elegans*-Homolog zu iASPP, welches p53 bindet und inhibiert.

Es wurden jedoch auch Gene identifiziert, welche den Keimzelltod nach ihrem „knock-down“ in einer p53-unabhängigen Art und Weise auslösen. Zu ihnen gehört z.B. *ced-9*.

1.10. Die Oogenese bei *Hydra vulgaris*

Hydren sind 3 - 20 mm große Süßwasserpolyphen, welche zu den einfachsten Metazoen, den Cnidariern (Nesseltiere) gehören. Entwicklungsgeschichtlich handelt es sich also um einen Organismus an der Basis der Evolution vielzelliger Tiere.

Hydra besteht aus zwei Epithelien, der äußeren Epidermis und der inneren Gastrodermis, welche durch eine nichtzelluläre Mesogloea voneinander getrennt sind. Auf der apikalen Seite befindet sich ein Mund mit Tentakeln, basal gibt es ein adhesives Organ, den Fuß (Abb. 13). Zwischen den Epithelzellen beider Zellschichten findet man interstitielle Zellen. Diese Zelllinie beinhaltet pluripotente Stammzellen, welche sich selbst erneuern können oder zu Nervenzellen, Drüsenzellen, Keimzellen oder Nematozyten differenzieren (David und Murphy, 1977). Nematozyten sind für Cnidarier spezifische Zellen, sie bilden die Nematozysten, mit deren Hilfe *Hydra* ihre Beute fängt.

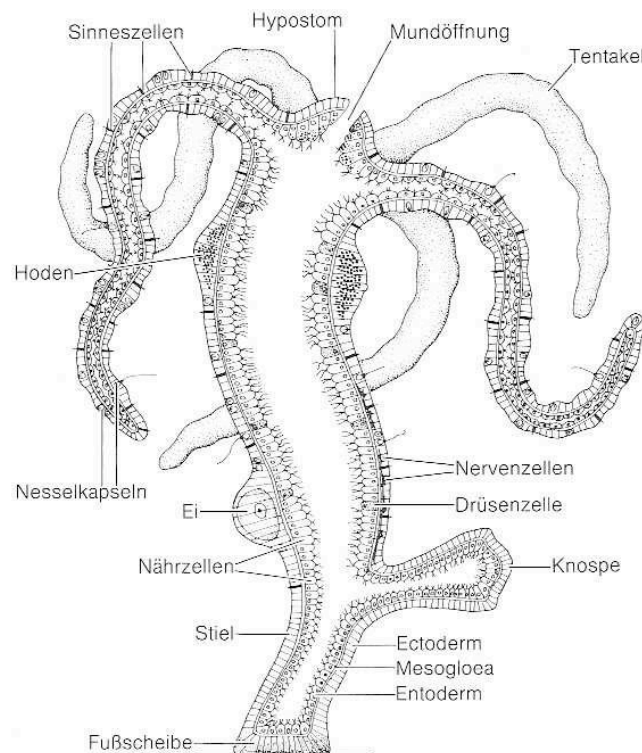


Abbildung 13: Aus (Kükenthal, Zoologisches Grundpraktikum).

Längsschnitt durch *Hydra*, schematisch. Zellkerne im Ektoderm nicht eingezeichnet.

Die Fortpflanzung erfolgt vor allem asexuell durch Knospung, wobei die Knospen im basalen Bereich des Rumpfes gebildet werden. In Abhängigkeit von Umweltfaktoren können jedoch auch Geschlechtszellen gebildet werden. Man kann dann männliche und weibliche Tiere voneinander unterscheiden (Abb. 14). Die Männchen bilden Gonaden, in denen Spermien produziert werden. Die Weibchen bilden Eier. Aus dem befruchteten Ei schlüpft nach mehreren Monaten ein fertiger Polyp.

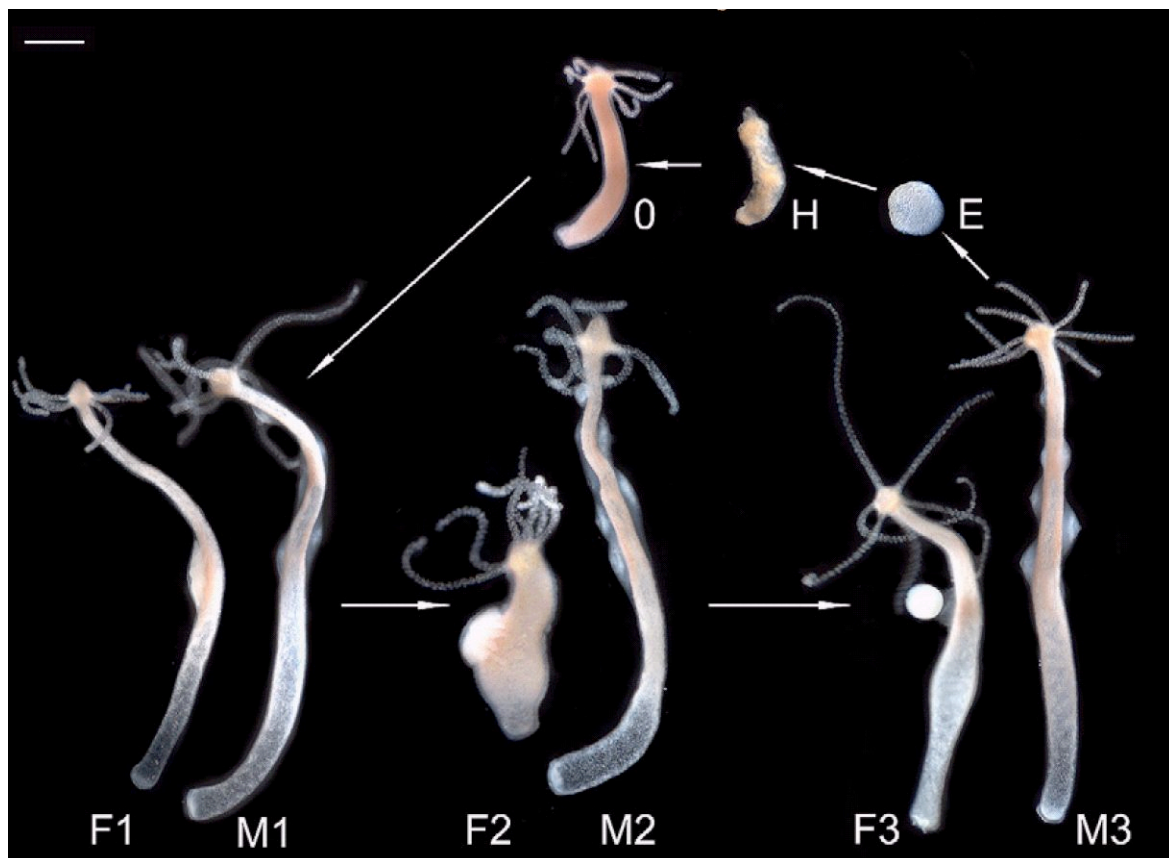


Abbildung 14: Verändert aus Böttger und Alexandrova (2007).

Sexueller Fortpflanzungszyklus von *Hydra vulgaris*.

Hydra vermehrt sich sexuell, indem die Weibchen und Männchen Gonaden bilden. Es sind jeweils drei Stadien der weiblichen und männlichen Keimzeldifferenzierung gezeigt (F1-F3, weiblich, M1-M3, männlich). Nach der Befruchtung der Oozyte schlüpft das Tier (H) aus dem Ei (E) und entwickelt sich zu einem erwachsenen Polypen (0). Maßstabsbalken 100 µm.

In *Hydra* besitzen sowohl die pluripotenten Stammzellen als auch Keimzellen dichte Körperchen, welche man als Keimgranula bezeichnen könnte (Abb. 15). Die Anzahl der Körperchen nimmt mit der Differenzierung zu somatischen Zellen ab (Noda und Kanai, 1977). Die Körperchen haben keine deutlichen Membranen und befinden sich in der Nähe des Kerns oder sie sind mit Mitochondrien assoziiert. Die Körperchen sind rund, gelegentlich länglich oder ungleichmäßig geformt. Manchmal haben sie eine hellere Region im Zentrum. Oft sind zwei oder mehrere zusammen gruppiert.

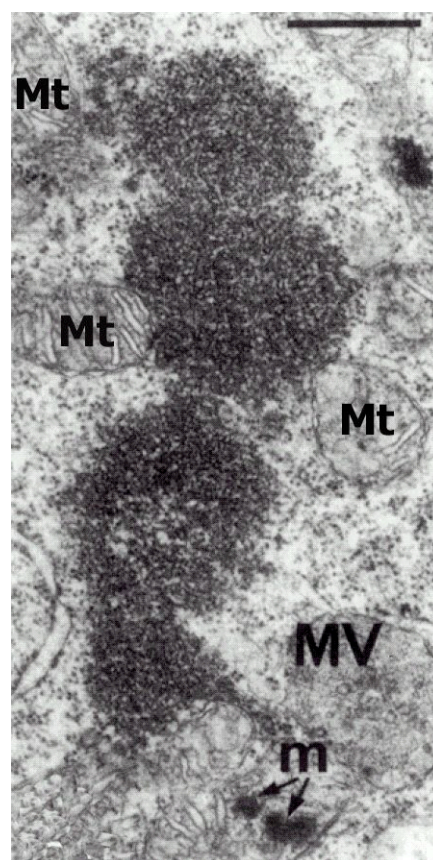


Abbildung 15: Verändert aus Noda und Kanai (1977).

Elektronenmikroskopische Bilder von „dichten Körperchen“ (Keimgranula) in *Pelmatohydra robusta*. Die Keimgranula sind oft mit Mitochondrien assoziiert. Mt-Mitochondrium, MV-multivesikuläre Körperchen, m-intramitochondriale Granula. Maßstabsbalken 0,5 μm .

Cnvas1 und *Cnvas2* sind zwei vasa-verwandte Gene in *Hydra* (Mochizuki et al., 2001). Es handelt sich um Mitglieder der DEAD-Box-Protein-Familie, welche bei der Entwicklung der Keimzellen in höheren Metazoen eine Rolle spielen. Mit Hilfe von in-situ-Hybridisierungen konnte festgestellt werden, dass die beiden *Hydra*-Gene nicht nur von den Keimzellen sondern auch von den multipotenten I-Zellen und den undifferenzierten ektodermalen Epithelzellen des Rumpfes exprimiert werden. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Gene dafür gebraucht werden, den undifferenzierten Status der Zellen oder auch das Fortschreiten des Zellzyklus aufrecht zu erhalten.

Hydra repräsentiert einen der einfachsten Organismen, welcher Komponenten der Apoptose-Maschinerie besitzt. Bei *Hydra* ist die Apoptose in die Regulation der Zellzahl auf Futterstimuli (Bosch und David, 1984; Cikala et al., 1999), in die Regeneration und in die Entfernung von körperfremden Zellen involviert (Kuznetsov et al., 2002). Sie spielt auch während der Oogenese bei der Aufrechterhaltung der Homöostase der Keimzellen eine Rolle und man kann eine spezielle „angehaltene“ Art der Apoptose in den Nährzellen beobachten (Alexandrova et al., 2005; Honegger et al., 1989; Miller et al., 2000; Technau et al., 2003).

Nach Miller et al. (2000) wird die Oogenese in *Hydra vulgaris* anhand von morphologischen Kriterien in 7 Stadien unterteilt. Der gesamte Prozess dauert 6 Tage. Die Oogenese findet bei *Hydra* in einem sogenannten Eifleck im Ektoderm der weiblichen Tiere statt. Tausende von Zellen aggregieren und proliferieren unterhalb des ektodermalen Epithels (Downing, 1909; Kleinenberg, 1872; Wager, 1909). Letztendlich wird nur eine von ihnen, welche in der Mitte lokalisiert ist, zur Oozyte (Honegger et al., 1989). Der Mechanismus, durch welchen diese Zelle ausgewählt wird, ist bisher nicht bekannt. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass die Expression von *CnOtx*, dem *Hydra*-Ortholog des *Drosophila*-Homeobox-Gens *orthodenticle*, dabei

eine Rolle spielen könnte. Das Gen wird während der Stadien 1 und 2 vorübergehend in einem Teil der aggregierenden interstitiellen Zellen innerhalb des Eiflecks exprimiert (Miller et al., 2000). Die Expression wird herunter reguliert, sobald die interstitiellen Zellen in der Mitte des Eiflecks mit der Differenzierung zu Nährzellen beginnen. Da zu diesem Zeitpunkt auch die Oozyte erscheint, könnte die *CnOtx*-Expression mit der Festlegung und / oder der Differenzierung der Oozyte im Zusammenhang stehen. Die restlichen Zellen innerhalb des Eiflecks differenzieren zu Nährzellen. Sie geben ihr Zytoplasma an die Oozyte ab (Honegger et al., 1989), gehen in die Apoptose und werden letztendlich von der Oozyte phagozytiert. Es gibt Hinweise darauf, dass *HyGSK3* und die Caspase 3A bei der frühen Induktion der Apoptose in den Keimzellen eine Rolle spielen (Rentzsch et al., 2005; Technau et al., 2003). Das Expressionsniveau von GSK-3 ist während der frühen Stadien der Oogenese hochreguliert. Nachdem die Oozyte ausgewählt wurde, geht das Niveau wieder runter. Die Zugabe von GSK-3-Inhibitoren zu frühen Stadien der Oogenese führt zu Defekten bei der Entwicklung der Oozyte, weil die Nährzellen nicht in die Apoptose gehen. Auch das mRNA-Niveau der Caspase 3A ist zu frühen Stadien der Oogenese bis zum Stadium 4, an dem alle Nährzellen von der Oozyte phagozytiert wurden, erhöht. Weiterhin konnte die Zugabe von Caspase-Inhibitoren zu frühen Stadien den Prozess der Oogenese stoppen, weil die Nährzellen nicht in die Apoptose gehen. Die Zugabe von Caspase-Inhibitoren zu späteren Stadien hat hingegen keinen Effekt.

Nach der Induktion der Apoptose werden die Nährzellen von der Oozyte phagozytiert. Die phagozytierten Zellen können mit Acridin Orange angefärbt werden, was einen Beweis dafür liefert, dass Apoptose stattfindet. Das apoptotische Programm wird in den phagozytierten Zellen dann allerdings bis zum Schlüpfen des Embryos angehalten. Die Phagozytose der Nährzellen durch die Oozyte scheint sie vor ihrem Abbau zu bewahren (Technau et al. 2003). Während der Furchungsteilungen werden die apoptotischen Körperchen an die Zellen des sich entwickelnden Embryos verteilt. Dort verweilen sie im Zytoplasma, bis der Embryo schlüpft, was oft mehrere Monate dauern kann (Honegger et al., 1989; Zihler, 1972). Es gibt Hinweise darauf, dass Peroxidase die Apoptose in den Nährzellen bis zum Schlüpfen des Embryos

verhindert (Technau et al., 2003). Nach dem Schlüpfen läuft das apoptotische Programm in den phagozytierten Nährzellen weiter und sie werden abgebaut. So dienen sie letztendlich als Nahrung für das Junge.

Die ersten Apoptosegene, welche in *Hydra* entdeckt wurden, waren zwei Caspase-Homologe (Cikala et al., 1999). Auf der Basis ihrer Homologie zu der *C. elegans*-CED-3 und der humanen Caspase 3 wurden sie Hv-Caspase 3A und 3B genannt. Inzwischen wurden mit Hilfe des „*Hydra* whole genome sequencing“ und des EST-Sequenzier-Projektes 10 Caspase-Gene gefunden (Böttger und David, nicht publizierte Beobachtungen). Es gibt auch Mitglieder der *bcl-2*-Genfamilie in *Hydra*. Es wurden Gene identifiziert, welche für HyBcl-2, HyBak und HyBax codieren (Manuskript in Vorbereitung und Müller-Taubenberger et al., 2006). In Analogie zu ihrer Rolle in höheren Metazoen könnten diese Proteine das Freilassen von Caspase-Proenzymen aus den Mitochondrien regulieren. Zusätzlich wurden vier Isoformen von 14-3-3-Genen aus *Hydra* kloniert, welche phosphorylierte Zielproteine binden können (Pauly et al. 2007). Die vier Isoformen wurden 14-3-3-HyA, 14-3-3-HyB, 14-3-3-HyC und 14-3-3-HyD genannt.

Mitglieder der 14-3-3-Protein-Familie sind in die Regulation entscheidender zellulärer Prozesse involviert. So spielen sie eine wichtige Rolle beim Metabolismus, der Signalweiterleitung, der Zellzykluskontrolle, der Apoptose, der Transkription, bei Stressantworten und bösartigen Transformationen. 14-3-3-Proteine agieren als Adapterproteine, welche Protein-Protein-Interaktionen stimulieren. Sie regulieren die subzelluläre Lokalisation von Proteinen und sie aktivieren oder inhibieren Enzyme. Bei der Signaltransduktion können 14-3-3-Proteine sowohl stimulierend als auch inhibierend wirken, wohingegen sie auf das Fortschreiten des Zellzyklus und auf die Apoptose immer nur einen inhibitorischen Effekt haben.

1.11. Zielsetzung der Doktorarbeit

Die Oogenese in *Hydra* wird heute als Modell für die Untersuchung von Signaltransduktionswegen (Fröbuis et al., 2003; Hobmayer, 2001; Miller et al., 2000) und als Modell für die Apoptose (Miller et al., 2000; Technau et al., 2003) in Invertebraten angesehen.

Viele Fragen waren jedoch bisher ungeklärt. So war bisher nicht bekannt, wie die Zellen innerhalb des Eiflecks organisiert sind, wie der Differenzierungsweg der Keimzellen aussieht oder wie die Oozyte wächst. Man wusste nicht, bis zu welchem Zeitpunkt sich die Oozyte und die Nährzellen gleich entwickeln und wann ihr Schicksal, Oozyte oder Nährzelle zu werden, festgelegt wird. Auch die Frage, ob sich innerhalb eines Eiflecks mehrere Oozyten entwickeln können, welche dann später fusionieren, war bisher unbeantwortet. Ziel dieser Arbeit war es daher, zunächst die komplexe Morphologie innerhalb des Eiflecks zu klären.

In diesem Zusammenhang sollte auch die Verteilung des Vasa-Proteins mit Hilfe von Antikörperfärbungen untersucht werden. Weiterhin stellte sich die Frage nach der Rolle von 14-3-3 für die arretierte Apoptose während der Oogenese in *Hydra*.

2. ERGEBNISSE

2.1. Induktion der Oogenese

Alle Versuche wurden mit Tieren vom Stamm AEP durchgeführt. Bei diesem Stamm handelt es sich um eine Kreuzung von Tieren aus einem See in Kalifornien und Tieren aus einem Bach in Philadelphia (Martin et al., 1997). Die Tiere zeigen Charakteristika von *Hydra vulgaris*, sind aber nicht völlig identisch mit der europäischen *Hydra vulgaris*. Die Bildung von Gameten kann durch Hungerphasen induziert werden. Es wurde folgendes Futterregime benutzt, um die Oogenese zu induzieren: Die Tiere wurden eine Woche nicht gefüttert und anschließend 2x pro Woche mit Futter versorgt. 10 bis 14 Tage nach dem Beginn der Hungerperiode bildeten sich männliche und weibliche Gonaden.

2.2. Mini-Mazeration zur Isolierung von Eifleck

Um die komplexe Morphologie innerhalb des Eiflecks zu verstehen, wurde zunächst eine Methode entwickelt, die es erlaubte, die Einzelzellen innerhalb des Eiflecks zu betrachten. Durch diese sogenannte Mini-Mazeration war es möglich, die Region des Eiflecks vom Rest des Gewebes zu trennen und dann in Einzelzellen zu dissoziieren. Die Hydren wurden zunächst mit Urethan narkotisiert. Mit Hilfe eines Skalpell wurde die Region des Eiflecks ausgeschnitten und in einen Tropfen Mazervationsflüssigkeit überführt (Abb.16). Nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten war es möglich, den Eifleck durch vorsichtiges Schütteln vom Rest des Gewebes und die Zellen zum gewünschten Grad voneinander zu trennen. Dabei löste sich die Region des Eiflecks zunächst vom Endoderm und dann vom Rest des Ektoderms. Durch Zugabe eines Tropfens Formaldehyd wurden die Zellen fixiert und schließlich auf einen gelatinisierten Objektträger übertragen. Dort wurden sie getrocknet und standen nun für weitere Behandlungen zur Verfügung.

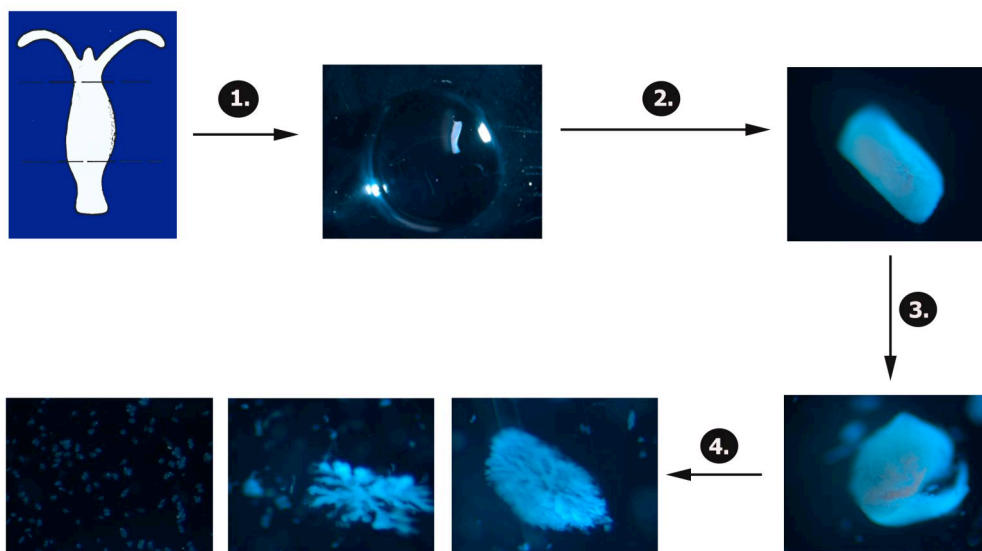


Abbildung 16: Mini-Mazeration zur Isolierung von Eifleck.

(1.) Region des Eiflecks wird ausgeschnitten und in einen Tropfen Mazervationsflüssigkeit überführt. (2.) Inkubation von 5 Minuten. (3.) Durch Schütteln löst sich die Region des Eiflecks zunächst vom Endoderm und dann (4.) vom Rest des ektodermalen Gewebes. Die Zellen innerhalb der Region des Eiflecks können bis zum gewünschten Grad voneinander getrennt werden.

2.3. Einteilung der Oogenesestadien

Die Einteilung der Oogenese in Stadien erfolgte hauptsächlich nach Miller et al. (2000). Lediglich das Stadium 3 wurde aufgrund morphologischer Veränderungen innerhalb des ganzen Tieres und aufgrund des Differenzierungsstatus der Oozyte (siehe unten) in die Unterstadien 3a und 3b unterteilt. Zusätzlich wurde die ungefähre Dauer der Stadien ermittelt (Abb. 17).

Stadium 1: Der erste morphologische Hinweis auf den Beginn der Oogenese ist das Erscheinen von Carotinoid Pigmenten in den endodermalen Epithelzellen. Das darüber liegende Ektoderm ist als transparente Anschwellung zu erkennen, da sich hier die interstitiellen Zellen ansammeln und proliferieren. Das Stadium 1 dauert 48h.

Stadium 2: Zu diesem Stadium ist der Eifleck dicker und nicht mehr durchsichtig. Er hat jetzt ein eher milchiges Aussehen. Das Stadium 2 erstreckt sich ebenfalls über einen Zeitraum von zwei Tagen.

Stadium 3a: Dieses Stadium ist durch das Erscheinen von mehreren weißen Punkten in der milchigen Region der verdickten ektodermalen Schicht charakterisiert. Die Mazeration des Eiflecks zeigte (siehe unten), dass es sich bei diesen weißen Flecken um Oozyten im frühen Diplotän handelt (150 µm im Durchmesser). Das Stadium 3a dauert 24h.

Stadium 3b: Der Eifleck erscheint sternförmig, wenn man das Tier von oben betrachtet. Zu diesem Stadium sind die Oozyten bereits sehr groß (600 µm im Durchmesser) und bilden verzweigte Pseudopodien. Das Stadium ist mit nur 18h relativ kurz.

Stadium 4: Dieses Stadium ist charakterisiert durch das schildförmige Aussehen des Eiflecks. In ganzen Tieren kann man deutlich eine oder zwei große Oozyten sehen, welche mit der Phagozytose beginnen. Das Stadium dauert ca. 4h.

Stadium 5: Die Pseudopodien der Oozyte ziehen sich immer weiter zurück. Von diesem Stadium an gibt es nur noch eine Oozyte innerhalb des Eifleckes. Das Stadium dauert ca. 3h.

Stadium 6 und 7: Diese Stadien sind sehr kurz. Die Oozyte beendet die Phagozytose, zieht ihre Pseudopodien nun vollständig zurück und kugelt sich ab. Der Kern der Oozyte vollzieht zwei meiotische Teilungen und die Oozyte bricht innerhalb von 15 Minuten durch das Ektoderm. Sie ist nun bereit für die Befruchtung.

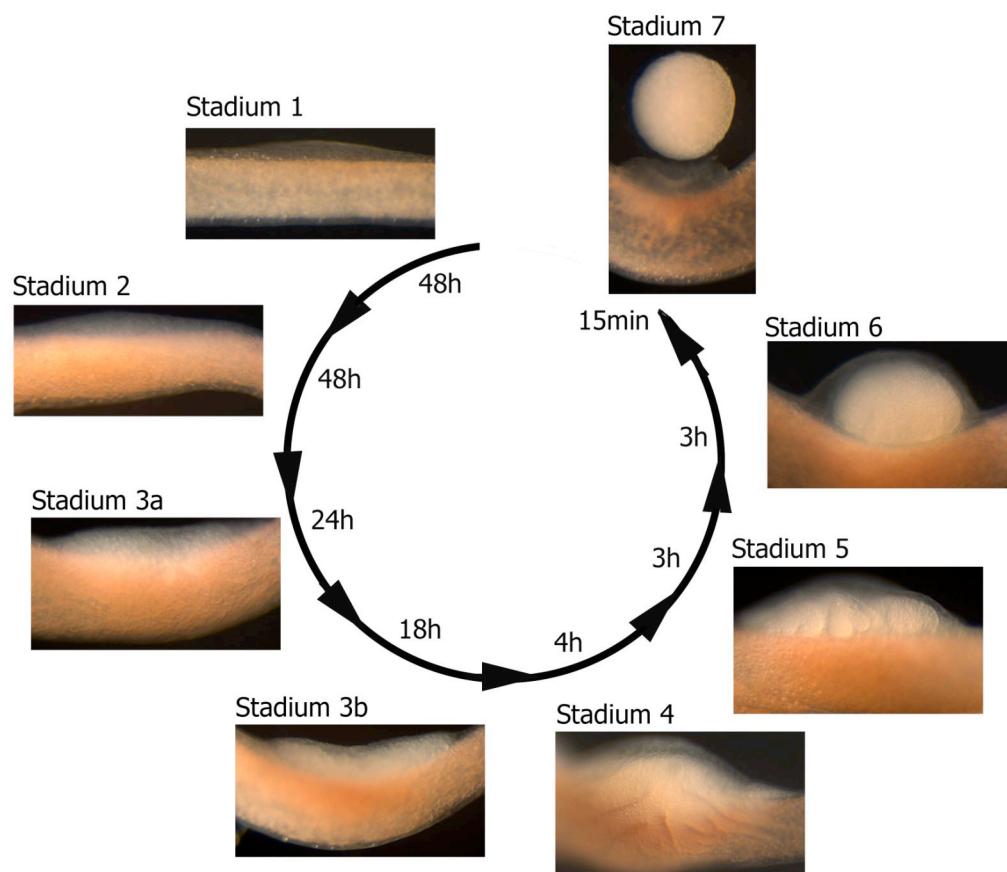


Abbildung 17: Stadien der Oogenese von *Hydra vulgaris*.

Die Bilder zeigen die morphologisch voneinander zu unterscheidenden Stadien. Die Dauer der einzelnen Stadien ist dabei in Stunden angegeben. Der gesamte Prozess der Oogenese erstreckt sich über 6 Tage. Der Eifleck, in dem die Oogenese stattfindet, besteht aus ca. 4000 Zellen, von denen nur eine zur Oozyte wird.

2.4. Zelltypen innerhalb des Eiflecks

2.4.1. Keimzelltypen

Aufgrund von Beobachtungen war es möglich, vier morphologisch voneinander unterscheidbare Typen von Keimzellen zu beschreiben. Gemäß dem Stadium ihrer Differenzierung wurden sie GCI (für Germ Cell, Keimzelle) bis GCIV genannt. Die verschiedenen Keimzelltypen konnten sowohl in Mazeraten als auch in ganzen Tieren nachgewiesen werden.

GCI-Zellen kommen in Gruppen von 4 und 8 Zellen vor (Abb. 18A). Sie entstehen durch synchrone Teilungen von Vorläuferzellen (Littlefield, 1991). Die Zellen innerhalb einer Gruppe sind über zytoplasmatische Brücken miteinander verbunden (Fawcett et al., 1959). Sie sind oval, haben homogenes Zytoplasma und einen Durchmesser von 15 µm. Sie sind damit größer als Nematozytenvorläufer und so gut von ihnen zu unterscheiden. Ihr Kern ist rund, hat normalerweise einen Nukleolus und misst 7 µm im Durchmesser.

GCII-Zellen sind größer als GCI (20-25 µm im Durchmesser). In ihrem sonst homogenen Zytoplasma haben sie ein einzelnes dunkles Granulum, welches ca. 2 µm im Durchmesser misst (Abb. 18B). Ihr Kern (10 µm) ist größer als der Kern der GCI und er enthält in der Regel zwei Nukleoli.

GCIII-Zellen sind noch größer (40 µm im Durchmesser). Ihr Zytoplasma ist stark mit Vakuolen durchsetzt und es enthält mehrere Granula, von denen gezeigt wurde, dass sie Lipide und Glykogen enthalten (Aizenshtadt, 1975; Honegger et al., 1989). Ihr Kern besitzt normalerweise nur einen Nukleolus und hat einen Durchmesser von 10 µm (Abb. 18C). Ist in früheren Publikationen von „Nurse“-Zellen die Rede, so ist dieser Zelltyp gemeint.

Einige Gruppen der GCIII enthalten eine oder zwei offensichtlich größere Zellen (100 μm im Durchmesser). Bei ihnen handelt es sich um **GCIV-Zellen** (Abb. 18D). Sie haben dasselbe Zytoplasma wie die GCIII, aber ihr Kern ist vergrößert (20-30 μm) und enthält kondensierte Chromosomen, wie es für die frühe meiotische Prophase I typisch ist. Konfokale optische Schnitte von ganzen Hydren zeigen, dass sich die GCIV-Zellen meistens in der Nähe der Mesogloea befinden.

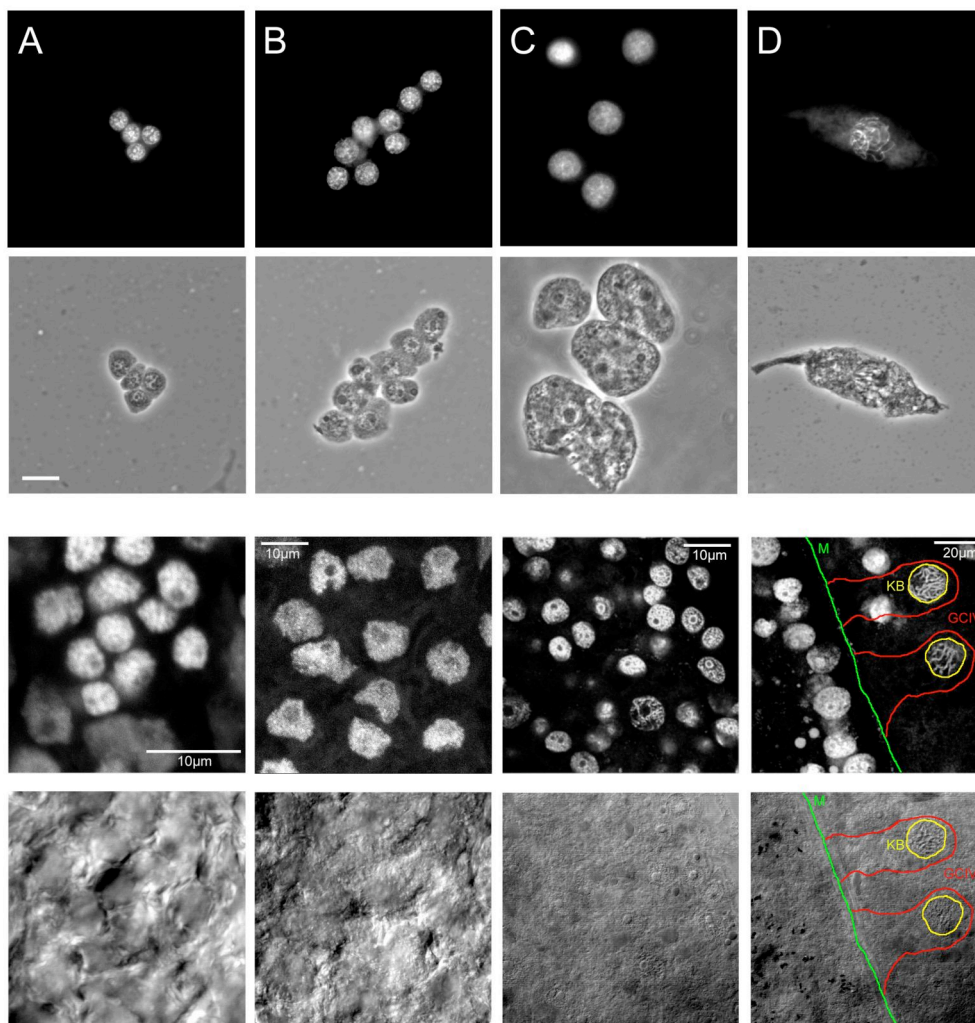


Abbildung 18: Die Differenzierung der Keimzellen.

Die Bilder zeigen morphologisch voneinander zu unterscheidende Zelltypen innerhalb des Eiflecks. Von links nach rechts die GCI (A), GCII (B), GCIII (C) und GCIV (D). Die Kerne wurden mit DAPI gefärbt (erste und dritte Reihe). Die dazugehörigen Phasenkontrastbilder sind in den jeweiligen Reihen darunter zu sehen (zweite und vierte Reihe). In der Reihe eins und zwei sind die verschiedenen Zelltypen in Mazeraten zu sehen, in den Reihen drei und vier im ganzen Tier. KB-Keimbläschen (gelb), Umriss der GCIV (rot), M-Mesogloea (grün). Maßstabsbalken obere Reihe 20 μm .

2.4.2. Differenzierungsstadien der Oozyten

Die verschiedenen Entwicklungsstadien der Oozyten konnten sowohl in Mazeraten als auch im ganzen Tier nachgewiesen werden.

Im Stadium 3a werden zwei oder drei GCIV innerhalb eines Eiflecks deutlich größer als die anderen (150 μm im Durchmesser; Abb. 19, links oben). Sie treten in das Diplotän-Stadium der Meiose I ein. Ihr Kern vergrößert sich, um das Keimbläschen zu bilden, während die Chromosomen kondensieren und sich in einer kleinen Region des Keimbläschens konzentrieren, wo sie eine Karyosphäre bilden. Zellen in diesem Stadium werden als **Oozyten** bezeichnet. Das Zytoplasma der Oozyten enthält die für die GCIII und GCIV typischen Vakuolen und Granula.

Während des Stadiums 3b nehmen die Oozyten schon vor der Phagozytose benachbarter Keimzellen dramatisch an Größe zu (Abb. 19, links unten und rechts). Sie bilden verzweigte Pseudopodien aus und erreichen einen Durchmesser von bis zu 600 μm , was einer 50- bis 100-fachen Zunahme des Zytoplasmavolumens entspricht. Als Resultat dieser schnellen Volumenzunahme kommen die Oberseiten der Oozyten in Kontakt mit der ektodermalen Oberfläche, und die Keimbläschen (50 bis 100 μm im Durchmesser) ändern ihre Position von der Mitte der Oozyten hin zu dieser Kontaktstelle.

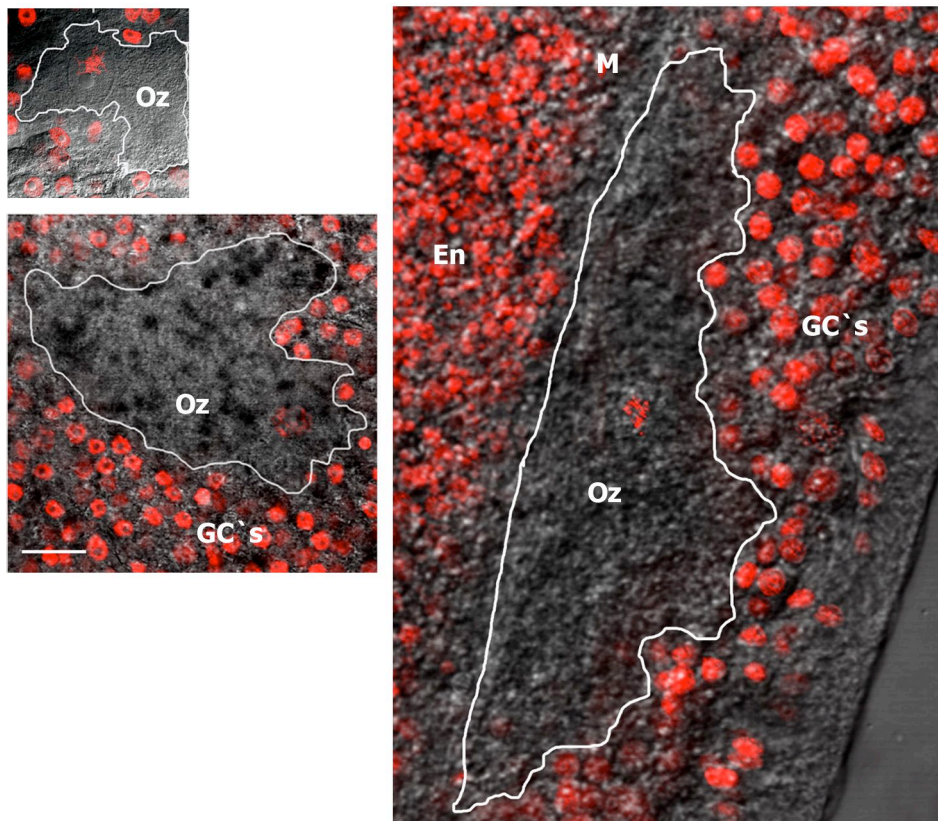


Abbildung 19: Konfokale Bilder von Eifleckchen der Stadien 3a und 3b.

Kerne sind in rot mit TOP-RO-3 gefärbt. Die großen Bereiche mit nur einem gefärbten Kern zeigen die wachsenden Oozyten. Der äußere Rand der wachsenden Oozyten ist jeweils weiß skizziert. Links oben: Stadium 3a zeigt eine frühe Oozyte mit einem Keimbläschen. Links unten: Stadium 3b zeigt eine wachsende Oozyte mit Chromosomen im Diplotän (Durchmesser 200 µm). Rechts: Spätes Stadium 3b zeigt eine Oozyte, welche entlang der Mesogloea liegt (600 µm in der Länge). Der Kern der Oozyte zeigt Chromosomen im Diplotän. Alle Bilder sind für den Größenvergleich im gleichen Maßstab gezeigt. En-Endoderm, M-Mesogloea, GC`s-Keimzellen, Oz-Oozyte. Maßstabsbalken 40 µm.

Im Stadium 4 beginnen die Oozyten mit der Phagozytose der benachbarten Zellen (Abb. 20, links). Als Resultat füllt sich das Ooplasma mit etlichen phagozytischen Vakuolen, welche apoptotische Körperchen enthalten. Letztere wurden zuvor als Schrumpfzellen (Zihler, 1972) oder Endozyten (Aizenshtadt, 1978; Fröbuis et al., 2003) beschrieben.

Vom Stadium 5 an gibt es nur noch eine Oozyte innerhalb des Eiflücks, welche mit dem Zurückziehen der Pseudopodien beginnt. Das Ooplasma dieser Oozyte enthält ein großes Keimbläschen und zusätzlich 1 bis 2 degenerierende Kerne. Bei den degenerierenden Kernen scheint es sich um Kerne von Oozyten zu handeln, welche miteinander fusioniert sind, um eine einzige übrigbleibende Oozyte zu bilden (siehe unten).

Letztendlich zieht die Oozyte in den Stadien 6 und 7 ihre Pseudopodien vollständig zurück und kugelt sich ab. Sie stoppt mit der Phagozytose der benachbarten Zellen. Ihr Kern durchläuft zwei meiotische Teilungen, sie bricht durch das Ektoderm und ist bereit für die Befruchtung (Abb. 20, rechts).

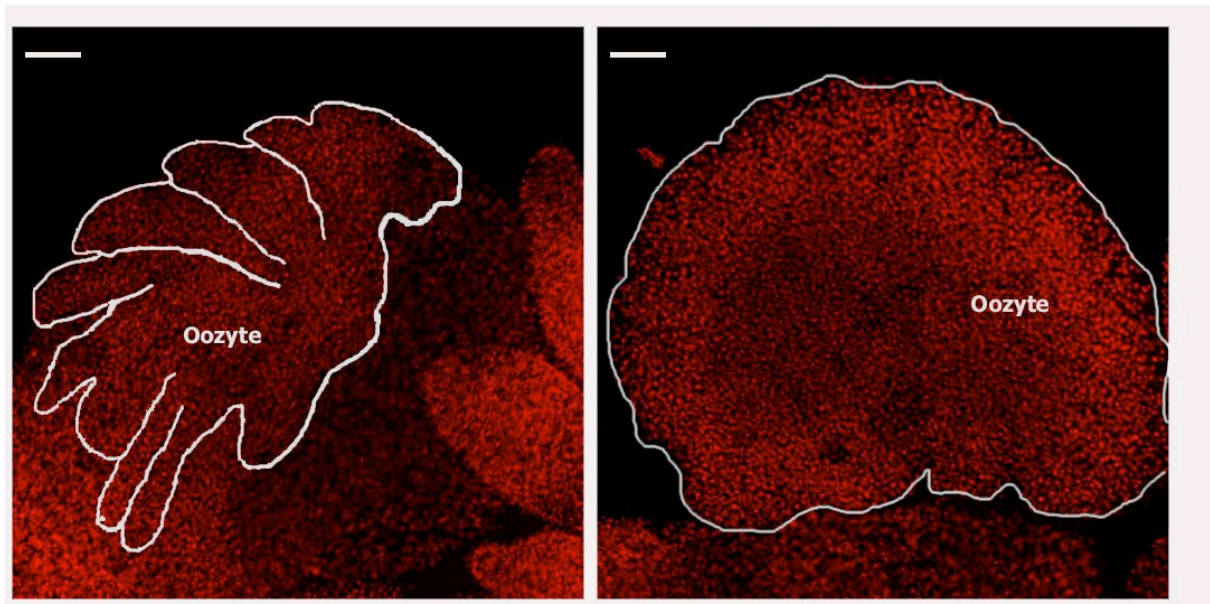


Abbildung 20: Konfokale Bilder von Eiflücken der Stadien 5 und 7.

Kerne sind in rot mit TOP-RO-3 gefärbt. Der äußere Rand der wachsenden Oozyten ist jeweils weiß skizziert. Links: Die Oozyte beginnt im Stadium 4 mit der Phagozytose der apoptotischen Körperchen. Rechts: Im Stadium 7 bricht die Oozyte durch das Ektoderm. Ihr Ooplasma ist mit apoptotischen Körperchen angefüllt. Maßstabsbalken 100 µm.

2.5. Zellzusammensetzung des Eiflecks zu verschiedenen Stadien der Oogenese

Nachdem die unterschiedlichen Zelltypen innerhalb des Eiflecks charakterisiert wurden, konnte die exakte Zellzusammensetzung des Eiflecks zu verschiedenen Stadien der Oogenese bestimmt werden. Die Zellzusammensetzung wurde während der Stadien 1 bis 3b ermittelt. Es wurde der prozentuale Anteil der GCI bis GCIII innerhalb des Eiflecks bestimmt.

Die Anzahl der GCI und GCII nimmt im Verlauf der Oogenese stetig ab, während die der GCIII dramatisch zunimmt (Abb. 21). Zum Ende des Stadiums 3b besteht der Eifleck daher fast vollständig aus GCIII.

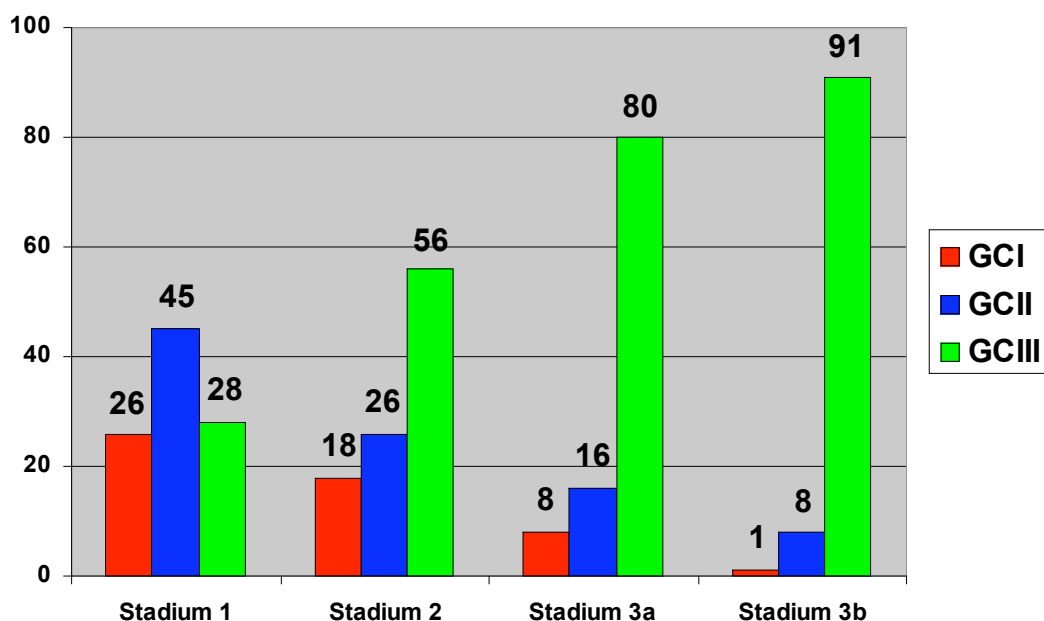


Abbildung 21: Zellzahl.

Einzelne Eiflecke wurden zu verschiedenen Stadien der Oogenese mazeriert und der prozentuale Anteil der verschiedenen Zelltypen wurde bestimmt. Die Eiflecken bestehen zu allen Stadien aus ca. 4000 Zellen. GCI-rot, GCII-blau, GCIII-grün.

2.6. DNA-Gehalt der Keimzellkerne

Die Veränderungen in der Zellzusammensetzung des Eiflecks zu verschiedenen Stadien der Oogenese sowie die Morphologie der unterschiedlichen Keimzelltypen deuteten darauf hin, dass diese Zellen eine Differenzierungsabfolge bilden. GCI-Zellen werden zu GCII-Zellen, welche später zu GCIII-Zellen differenzieren. Um die Differenzierungsabfolge genauer zu ermitteln, wurde der DNA-Gehalt der Kerne von GCI, GCII und GCIII bestimmt. Dazu wurden die Eiflecke in verschiedenen Stadien der Oogenese mazeriert. Die Zellen wurden mit dem DNA-spezifischem Fluorochrom DAPI angefärbt, um den DNA-Gehalt einzelner Zellen photometrisch zu bestimmen. Nervenzellen wurden dabei als Standard für einen diploiden ($2n$) DNA-Gehalt verwendet.

GCI-Zellen in kleinen Nestern (2 bis 4 Zellen) hatten einen DNA-Gehalt von $2n-4n$ (Abb. 22, oben links, rot). Dies ist typisch für proliferierende Zellen in *Hydra*. GCI-Zellen in großen Nestern (größer als 4 Zellen) hatten hingegen einen DNA-Gehalt von $2n$ (Abb. 22, oben rechts, rot), wie er typisch ist für postmitotische differenzierende Zellen in *Hydra* (David und Gierer, 1974).

Der DNA-Gehalt der GCII war typisch für Zellen in der S-Phase (Abb. 22, unten links, blau). Diese S-Phase scheint premeiotisch zu sein, da zumindest einige GCII in die Meiose eintreten (siehe unten).

Die GCIII waren charakterisiert durch einen DNA-Gehalt von $4n$ (Abb. 22, unten rechts, grün). Dies weist darauf hin, dass GCII-Zellen, welche ihre Replikation beendet haben, zu GCIII-Zellen werden. Die GCIII-Zellen nehmen dramatisch an Größe zu.

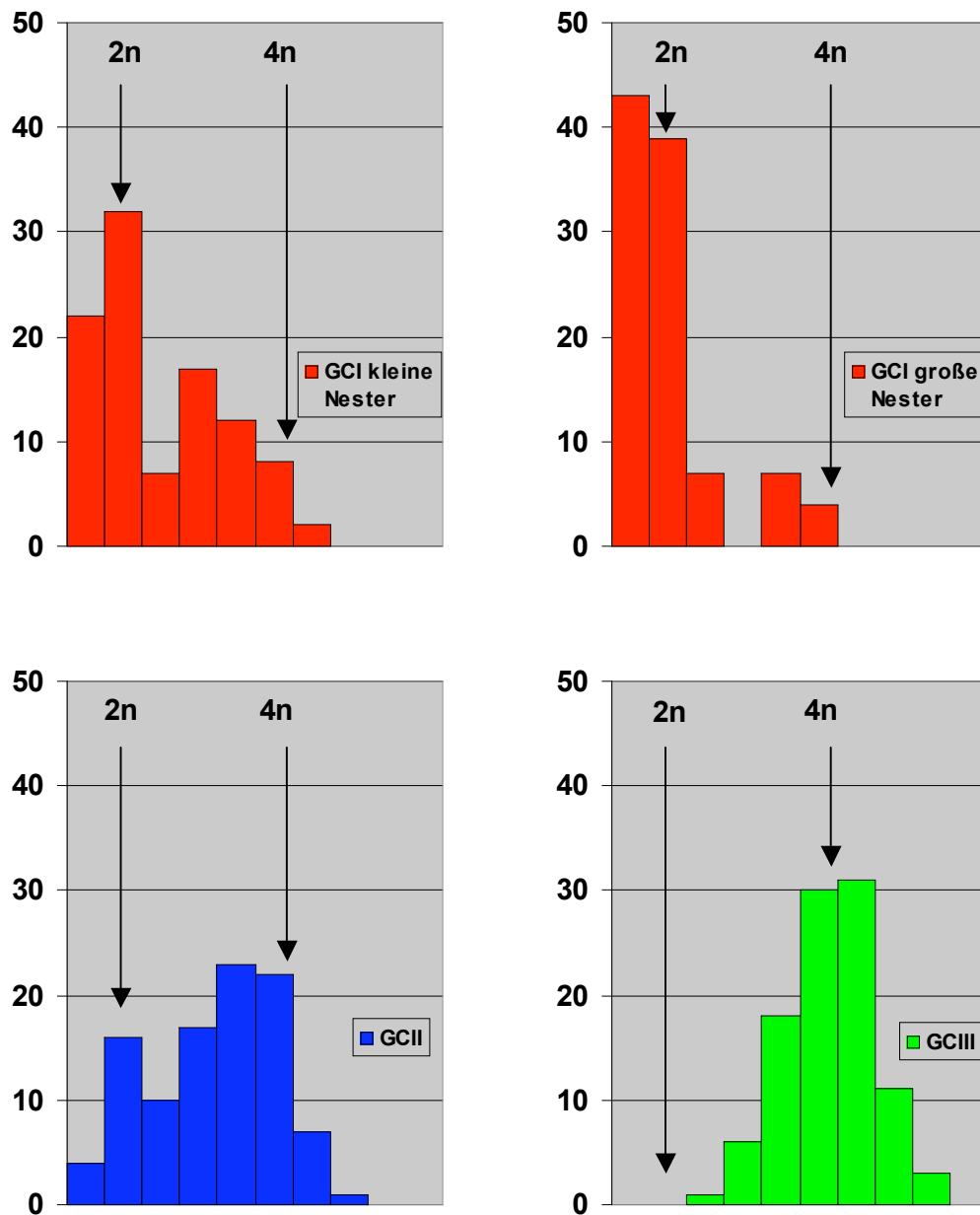


Abbildung 22: DNA-Gehalt der Keimzellkerne.

Die Histogramme zeigen den prozentualen Anteil von Zellen mit einem bestimmten DNA-Gehalt. Der DNA-Gehalt für 2n und 4n ist zum Vergleich angegeben. Bei den GCI wurde zwischen kleinen Nestern (bis 4 Zellen) und großen Nestern (bis 8 Zellen) unterschieden. GCI-rot, GCII-blau, GCIII-grün.

2.7. Markierungsindex

Zur Bestätigung der Ergebnisse der DNA-Messungen sollten die S-Phasen in den differenzierenden Keimzellen markiert werden. Dazu wurde den Hydran BrdU, ein Thymidin-Analog, in den Magenraum injiziert. Nach einer Inkubationszeit von 45 min wurden die Tiere mazeriert, um einzelne Zellen betrachten zu können. Weiterhin wurde der mitotische Index der verschiedenen Keimzelltypen bestimmt. Dadurch sollte ermittelt werden, ob sich die Zellen in den einzelnen Stadien noch teilten. Zusätzlich wurden auch Tiere als Ganzes fixiert, um einen Eindruck von der Verteilung der markierten Zellen innerhalb des ganzen Tieres zu bekommen.

Die Ergebnisse des BrdU Experimentes auf Mazeraten bestätigten die Ergebnisse der DNA-Messung.

GCI-Zellen in kleinen Nestern wurden durch einen BrdU-Puls zu ungefähr 50% markiert (Abb. 23, links oben). Dies deutet darauf hin, dass es sich bei den GCI-Zellen in kleinen Nestern um eine proliferierende Population handelt. Sie werden nach einer terminalen Mitose zu GCI in großen Nestern. Diese wurden durch den BrdU-Puls kaum markiert. Sie sind postmitotisch, haben die Differenzierung zu Oozyten bzw. „Nurse“-Zellen initiiert und befinden sich in der G1-Phase des Zellzyklus. Insgesamt wurden die GCI zu ca. 35% markiert (Abb. 23, rechts in rot). Ihr mitotischer Index lag bei 3%.

Im starken Kontrast zu den GCI-Zellen in großen Nestern, waren die meisten (80-90%) GCII-Zellen nach dem BrdU-Puls markiert (Abb. 23 links Mitte und rechts in blau). Sie befinden sich also in der S-Phase des Zellzyklus. Die GCII waren nie mitotisch.

GCIII-Kerne waren fast gar nicht BrdU markiert (Abb. 23, rechts in grün). Nur in einigen Nestern fand man einzelne BrdU-positive Kerne. Diese einzelnen markierten Kerne hatten ein für das Ende der S-Phase typisches Replikationsmuster. Es ist durch die Anwesenheit von wenigen großen Chromatinfoci charakterisiert, welche sich im gesamten Kern und besonders an seiner Peripherie befinden (Abb. 23, links unten). Es wurden keine mitotischen GCIII gefunden.

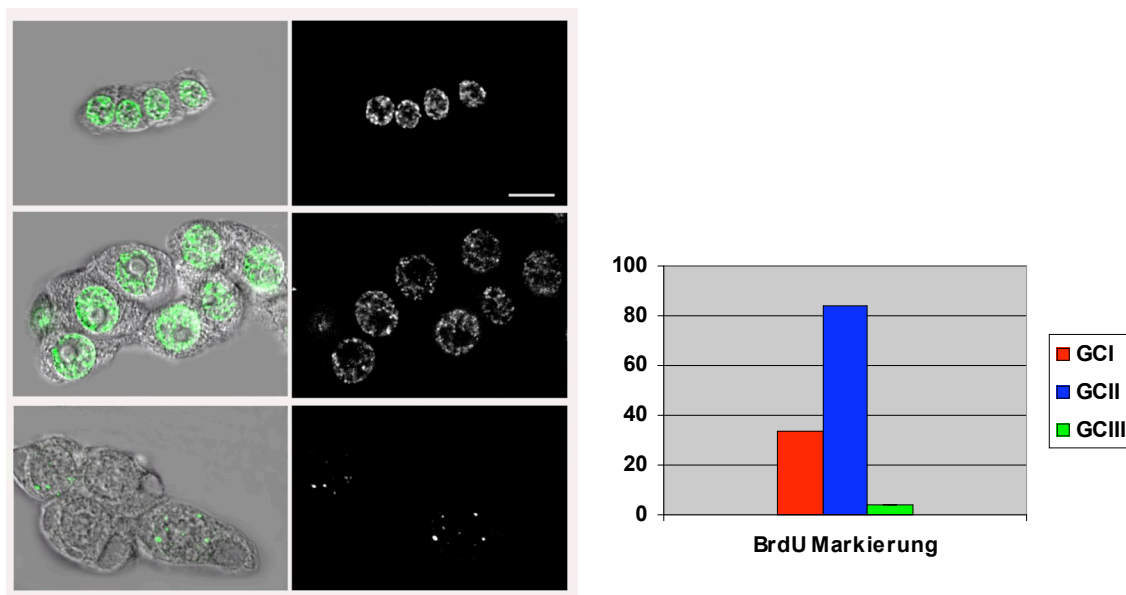


Abbildung 23: BrdU-Markierung von GCI, GCII und GCIII.

Links: Die Kerne der verschiedenen Zelltypen wurden durch einen Puls mit BrdU markiert. Von oben nach unten GCI, GCII und GCIII. In der linken Reihe sind die Phasenkontrastbilder über die markierten Zellkerne (grün) gelegt. In der rechten Reihe sind nur die Replikationsmuster zu sehen (weiß). Maßstabsbalken 10 µm.

Rechts: Gezeigt ist der prozentuale Anteil von markierten Zellen. GCI-rot, GCII-blau und GCIII-grün.

Zusätzlich wurde auch das BrdU-Markierungsmuster in ganzen Tieren zu verschiedenen Stadien der Oogenese betrachtet:

Im Stadium 1 der Oogenese waren Gruppen von verschiedenen Keimzelltypen innerhalb der Region des Eiflecks gefärbt (Abb. 24, obere Reihe). Die Anzahl der markierten Zellen nahm vom Stadium 2 zum Stadium 3a ab. Nach Miller et al. (2000) stoppen die Zellen in der Mitte des Eiflecks mit der Proliferation und beginnen mit der Differenzierung zu „Nurse“-Zellen. Diese Beobachtung konnte insofern bestätigt werden, dass im Stadium 3a in der Mitte des Eiflecks unmarkierte GCIII („Nurse“-Zellen) gefunden wurden (Abb. 24, untere Reihe, Mitte). Mit dem Beginn des Stadiums 3b wurden kaum noch markierte Zellen gefunden (Abb. 24, untere Reihe, rechts).

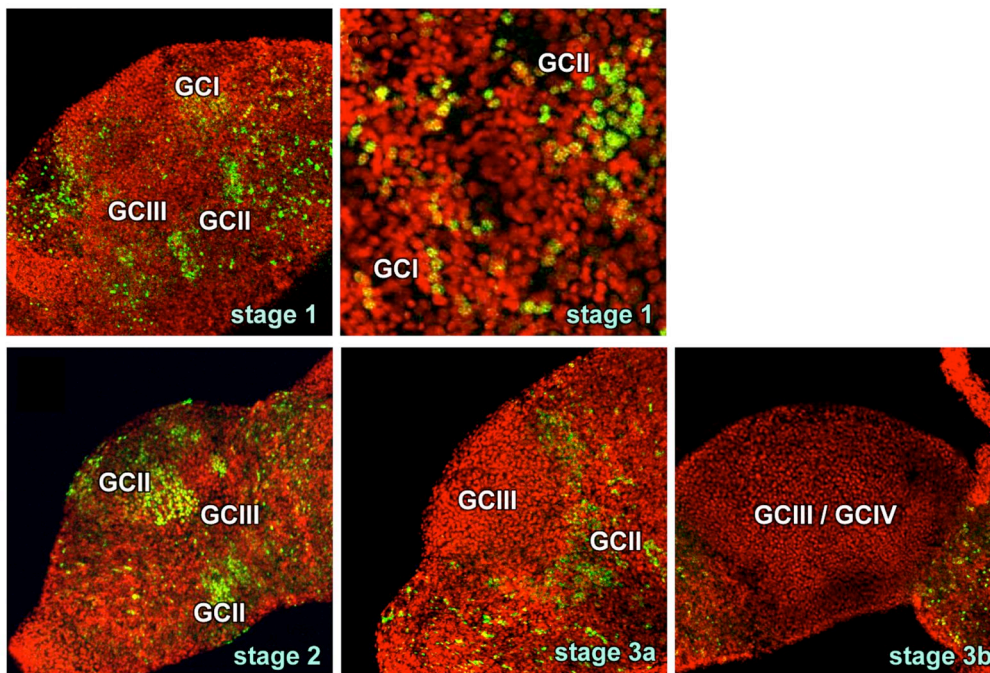


Abbildung 24: BrdU-Markierung von ganzen Tieren.

Die BrdU-Pulsmarkierung zeigt die Verteilung von Keimzellen, welche sich in der S-Phase des Zellzyklus befinden, innerhalb des Eiflecks. Kerne sind in rot mit TOP-RO-3 gefärbt. Die mit BrdU markierten Zellen sind in grün dargestellt (bzw. erscheinen sie gelb in der Überlagerung mit dem roten Kanal). Obere Reihe: Im Stadium 1 waren Gruppen von verschiedenen Keimzelltypen gefärbt. Die rechte Abbildung zeigt einen vergrößerten Ausschnitt aus dem linken Bild. Untere Reihe: Verteilung der markierten Keimzelltypen zu den Stadien 2, 3a und 3b. Die Anzahl der markierten Zellen nahm deutlich ab.

2.8. Fusion zwischen den Keimzellen und der Oozyte

Bei der Mazeration von Eifleckchen der Stadien 3a und 3b konnte beobachtet werden, dass die Verbindungen zwischen der wachsenden Oozyte und den GCIII/GCIV-Zellen fester wurden. Es war schwer, die Oozyte von den benachbarten Zellen zu trennen. Um herauszufinden, ob diese engen Kontakte Adhäsion oder Fusion von Schrumpfzellen mit der wachsenden Oozyte darstellten, wurden Tiere mit dem membranspezifischen fluoreszierenden Farbstoff FM 4-64 gefärbt und mit einem konfokalen Mikroskop gescannt. So war es möglich, die großen Oozyten und die eng benachbarten Keimzellen zu lokalisieren.

In den Bereichen, wo Keimzellen an andere Keimzellen grenzten, waren die Membranen zwischen den Zellen deutlich erkennbar (Abb. 25 die beiden linken Bilder). Anders verhielt es sich in den Bereichen, an denen die Oozyte Kontakt zu den Keimzellen hatte (Abb. 25 Pfeile in den beiden rechten Bildern). Dort fehlte die Membranfärbung oft über einen großen Bereich (10µm). Die beiden Zelltypen schienen hier miteinander fusioniert zu sein.

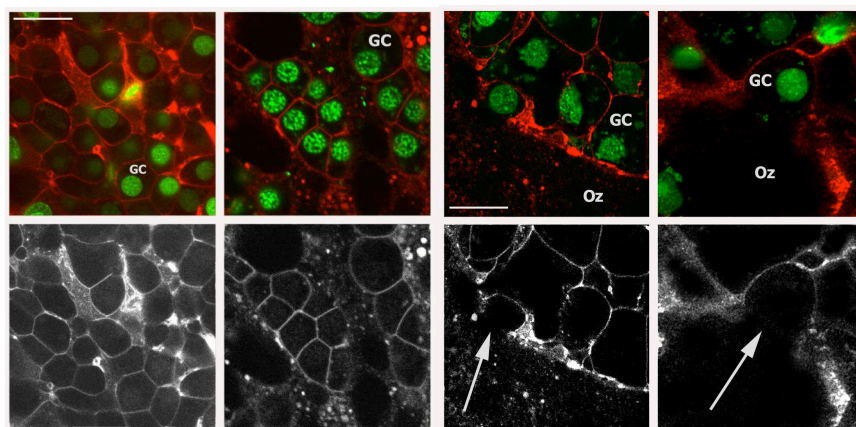


Abbildung 25: Membranfärbung mit FM 4-64 in Keimzellen und Oozyten.

Die Bilder zeigen Bereiche des Kontaktes zwischen Keimzellen (GC) und Oozyten (Oz) in verschiedenen Eifleckchen. Membranen sind mit FM 4-64 gefärbt (rot), Kerne mit SYTO-16 (grün). In der oberen Reihe wird die Membranfärbung zusammen mit der Kernfärbung gezeigt, während in der unteren Reihe nur die Membranfärbung zu sehen ist. Die beiden linken Bilder zeigen Bereiche des Kontaktes zwischen Keimzellen. Die Membranfärbung war deutlich zu erkennen und wies keine Lücken auf. Die beiden rechten Bilder zeigen Bereiche des Kontaktes zwischen der Oozyte und den Keimzellen. Die Pfeile deuten auf Bereiche, in denen die Membranfärbung deutlich fehlte. Maßstabsbalken 20 µm.

Um auszuschließen, dass es sich bei der Abwesenheit der Membranfärbung um einen Artefakt handelte, wurden benachbarte optische Schnitte betrachtet (Abb. 26). Es war deutlich zu erkennen, dass die Membranen in benachbarten optischen Schnitten wieder „auftauchten“.

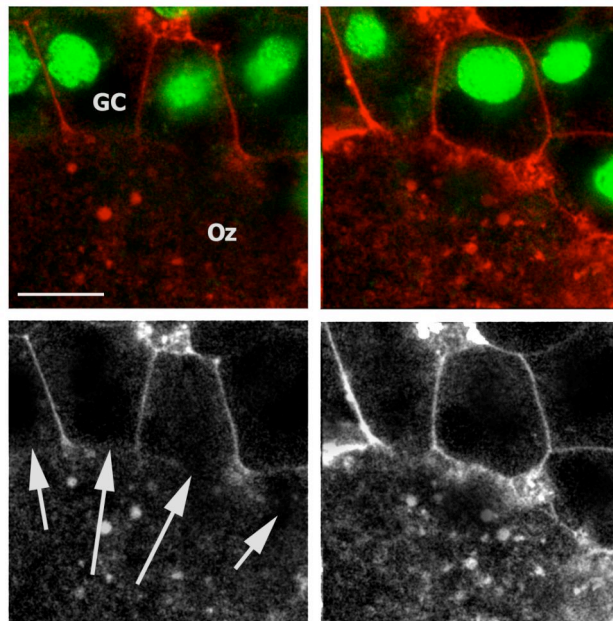


Abbildung 26: Membranfärbung mit FM 4-64 in Keimzellen und Oozyten.

Die Bilder zeigen Bereiche des Kontaktes zwischen Keimzellen (GC) und Oozyten (Oz). Im oberen Bereich der Bilder befinden sich die Keimzellen, im unteren Bereich die Oozyte. Membranen sind mit FM 4-64 gefärbt (rot), Kerne mit SYTO-16 (grün). In der oberen Reihe wird die Membranfärbung zusammen mit der Kernfärbung gezeigt, während in der unteren Reihe nur die Membranfärbung zu sehen ist. Die Bilder zeigen optische Schnitte derselben Zellen in einem Abstand von 3 μm . Die Pfeile im linken Bild deuten auf vier Bereiche, in denen die Membranfärbung zwischen den Keimzellen und der Oozyte klar fehlt. Im rechten Bild (im nächsten optischen Schnitt) sind die Membranen jedoch wieder da. Maßstabsbalken 20 μm .

An den Stellen, an denen die Membranfärbung fehlte, bildeten die Keimzellen und die Oozyte ein Kontinuum, so dass sich der Kern der Keimzellen im Zytoplasma der Oozyte befand. Diese Situation schien allerdings vorübergehend zu sein, da niemals einzelne Keimzellkerne im Zytoplasma der Oozyte gefunden wurden. Dies ließ vermuten, dass die Keimzellen rezellularisierten, nachdem sie mit der Oozyte fusioniert hatten.

2.9. Innerhalb eines Eiflecks kann es zunächst mehrere Oozyten geben

Zu den Stadien 3a und 3b waren stets mehrere Oozyten im Diplotän-Stadium der Meiose im Eifleck vorhanden. Zu späteren Stadien enthielt der Eifleck dann aber nur noch eine Oozyte. Aufgrund der vorangegangenen Beobachtung, dass Keimzellen in der Lage waren, mit der Oozyte zu fusionieren, stellte sich die Frage, ob auch die „Vorläuferoozyten“ miteinander fusionierten, um letztendlich nur eine Oozyte pro Eifleck zu bilden.

Es wurden ganze Tiere ab dem Stadium 5 auf das Vorhandensein von mehreren Oozytenkernen hin untersucht. Außerdem sollte der „Status“ der Kerne betrachtet werden.

Zu den späten Stadien der Oogenese wurde stets nur ein überlebender Oozytenkern gefunden (Abb. 27, oben). Er besaß eine intakte Kernmembran und die Chromosomen befanden sich innerhalb der Karyosphäre im Diplotän der Meiose. Die degenerierenden Kerne (Abb. 27, unten) wiesen hingegen eine defekte Kernmembran auf und ihre Chromosomen waren zusammen gruppiert. Da sich die degenerierenden Kerne nicht in Vakuolen befanden, konnte es sich bei ihnen nicht um phagozytierte Keimzellen handeln.

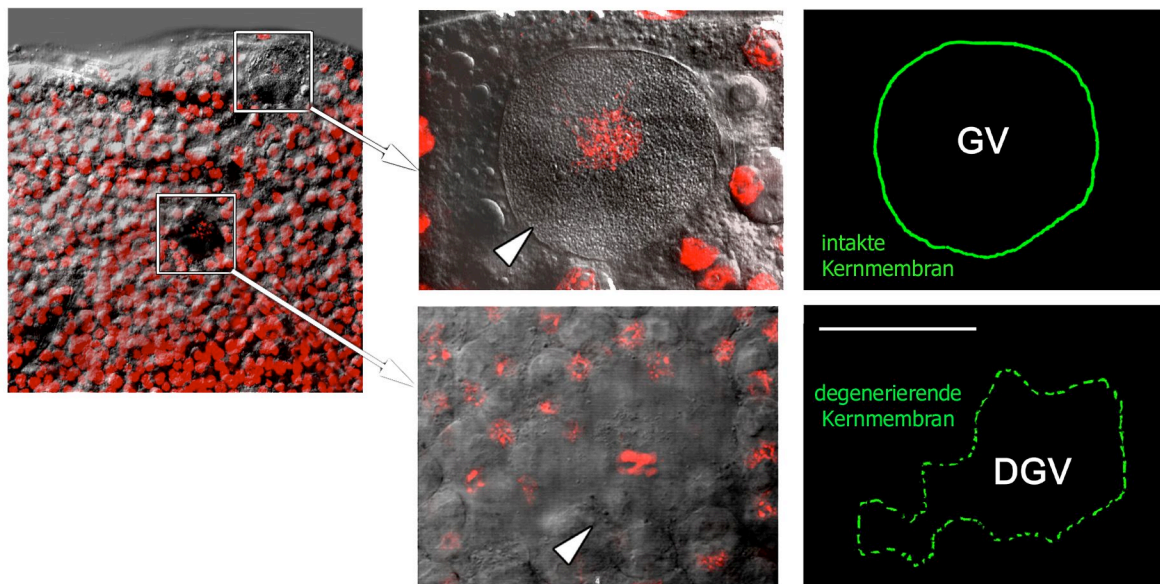


Abbildung 27: Intaktes Keimbläschen (GV) und degenerierendes Keimbläschen (DGV) in einer Oozyte im Stadium 5 der Oogenese.

Konfokale Schnitte eines Eiflücks, welcher mit TOP-RO-3 gefärbt wurde, um DNA zu färben (rot). Obere Reihe: Intaktes Keimbläschen mit intakter Kernmembran (Pfeilspitze) und Chromosomen im Diplotän innerhalb der Karyosphäre. Untere Reihe: Degenerierendes Keimbläschen mit defekter Kernmembran (Pfeilspitze) und gruppierte Chromosomen. Die grüne Linie in den rechten Bildern umrandet die Grenzen des intakten und des degenerierenden Keimbläschens. Die Abwesenheit einer phagozytischen Membran bei dem degenerierenden Keimbläschen ist klar zu erkennen. Maßstabsbalken 80µm.

2.10. Zytoplasmatransfer zwischen den Keimzellen und der Oozyte

Es konnte beobachtet werden, dass sowohl die Keimzellen in der Lage waren, vorübergehend mit der Oozyte zu fusionieren, als auch die Oozyten untereinander. Im weiteren Verlauf der Arbeit stellte sich die Frage, warum die Keimzellen zunächst mit der Oozyte fusionierten, anschließend jedoch wieder rezellularisierten. Eine Möglichkeit wäre, dass die Keimzellen auf diesem Weg ihr Zytoplasma an die Oozyte weitergeben. Um dieser Frage auf den Grund zu gehen, wurden Mazerate des Stadiums 3b nach dem Vorhandensein von „kleinen“ GCIII- und GCIV-Zellen mit wenig Zytoplasma hin untersucht.

Es wurden tatsächlich solche Zellen in einer signifikanten Anzahl (530 +/- 93 pro Eifleck, n= 5) gefunden (Abb. 28, rechts).

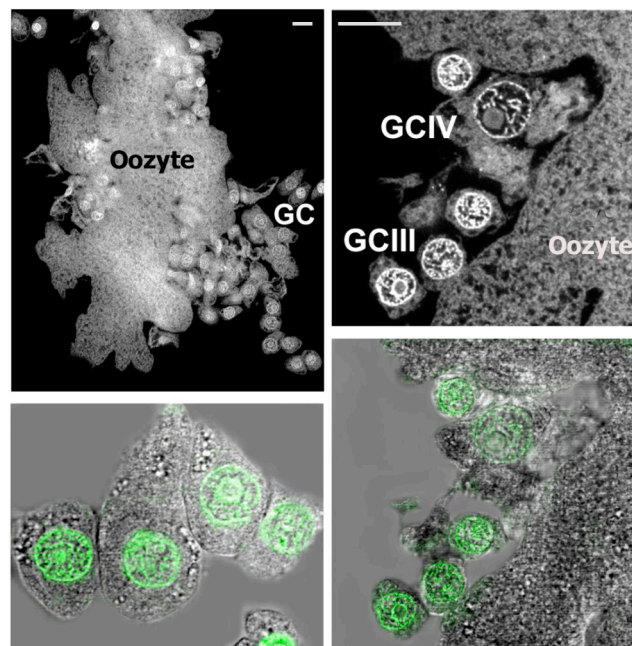


Abbildung 28: „Kleine“ Keimzellen mit wenig Zytoplasma.

Kerne sind mit TOP-RO-3 (grün in den unteren Bildern, weiß in den oberen) gefärbt. Links oben: Übersicht über eine mazerierte Oozyte im Stadium 3b. Die anhaftenden Keimzellen (GC) sind deutlich zu erkennen. Rechts oben: Vergrößerung eines Bereiches, in welchem die Keimzellen stark an der Oozyte haften. GCIII und GCIV mit wenig Zytoplasma im engen Kontakt mit der Oozyte. Rechts unten: Über das Bild rechts oben wurde der Phasenkontrast gelegt. So ist die geringe Menge an Zytoplasma gut zu erkennen. Links unten: Zum Vergleich GCIII und GCIV mit einer normalen Menge an Zytoplasma. Maßstabsbalken 20µm.

Aus diesen Ergebnissen kann man schlussfolgern, dass die Keimzellen vorübergehend mit der Oozyte fusionierten, um ihr Zytoplasma abzugeben und anschließend rezellularisierten. In der DAPI-Färbung fiel auf, dass die Kerne der „kleinen“ Zellen apoptotisch wirkten (Abb. 28, rechts oben). Dies sollte im Folgenden näher untersucht werden.

2.11. Apoptose der Keimzellen nach dem Zytoplasmatransfer

Wie oben beschrieben, enthielten Mazerate von Eifleckchen der Stadien 3b eine neue Klasse von „kleinen“ GCIII- und GCIV-Zellen mit wenig Zytoplasma. Die Färbung mit DNA-Farbstoffen ließ vermuten, dass die Kerne dieser Zellen apoptotisch waren. Das Chromatin war in kleinen Tropfen entlang der Kernmembran und im Inneren des Kernes kondensiert. Um zu beweisen, dass es sich tatsächlich um apoptotische Zellen handelte, wurden Mazerate mit TUNEL gefärbt. TUNEL ist ein Marker für Apoptose, da er fragmentierte DNA anfärbt (Gavrieli et al., 1992).

Es zeigte sich, dass die kleinen GCIII- und GCIV-Zellen in den Mazeraten TUNEL-positiv waren (Abb. 29, oben). Im Gegensatz dazu waren GCIII- und GCIV-Zellen mit einer normalen Menge an Zytoplasma, die sich in denselben Mazeraten befanden, TUNEL-negativ (Abb. 29, unten).

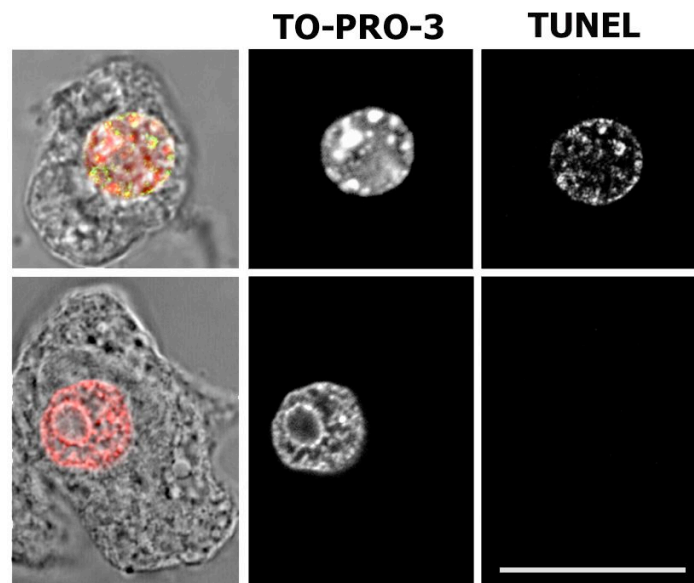


Abbildung 29: GCIII innerhalb des Eiflecks.

DNA wurde mit TOP-RO-3 gefärbt (Mitte weiß und links rot), die TUNEL-Färbung ist weiß (rechts) bzw. grün (links). Im linken Bild wurden die TOP-RO-3- und TUNEL-Färbung über das Phasenkontrastbild gelegt. Obere Reihe: Kleine GCIII mit reduzierten Zytoplasma. Der Kern hat gruppiertes Chromatin, typisch für Apoptose und er ist TUNEL-positiv. Untere Reihe: Große GCIII mit einer normalen Zytoplasmamenge. Der Kern zeigt keine Anzeichen von Apoptose und ist TUNEL-negativ. Maßstabsbalken 20µm.

Des Weiteren wurden voll entwickelte Oozyten in Mazerationsmedium zerquetscht, um phagozytierte Keimzellen freizusetzen und sie anschließend mit TUNEL zu färben.

Es konnten drei Typen von apoptotischen Körperchen im Zytoplasma von mazerierten Oozyten unterschieden werden:

Mittelgroße apoptotische Körperchen (Kern 10 μm) mit locker organisiertem Chromatin waren der häufigste Typ (Abb. 30, Mitte). Sie scheinen phagozytierte GCIII-Zellen darzustellen.

Kleine apoptotische Körperchen (Kern 5-7 μm) mit stark kondensiertem Chromatin repräsentieren phagozytierte GCII-Zellen (Abb. 30, oben).

Einige wenige sehr große apoptotische Körperchen (Kern 20 μm) mit Chromatin, welches in Fäden über die Kernfläche organisiert war, wurden auch gefunden (Abb. 30, unten). Sie repräsentieren phagozytierte GCIV-Zellen, von denen man ca. 50 in einem Eifleck finden kann.

Alle drei Typen der apoptotischen Körperchen hatten TUNEL-positive DNA.

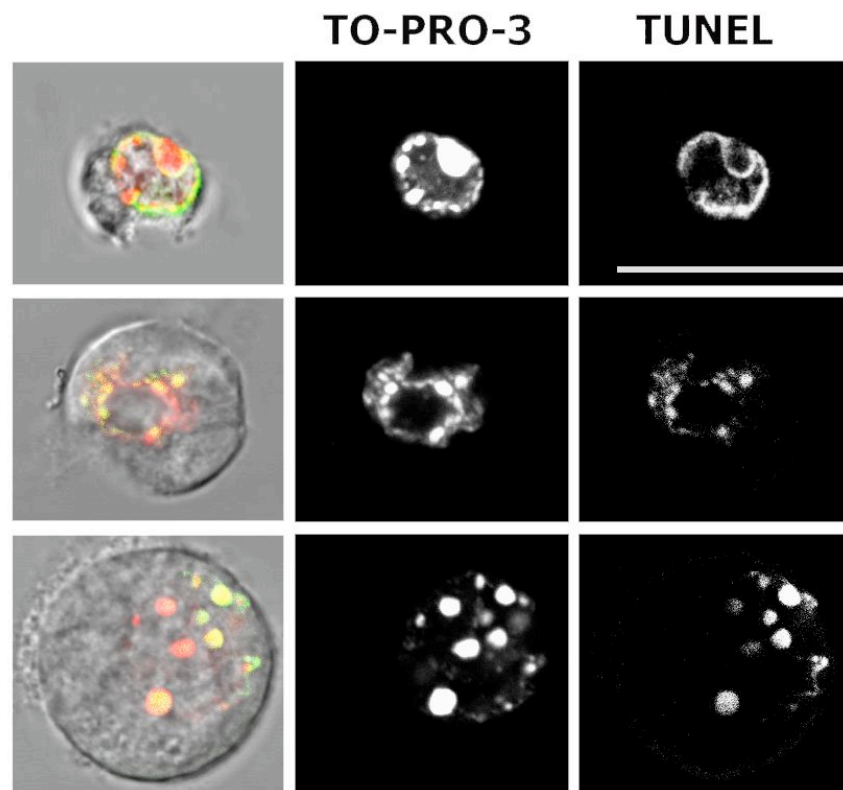


Abbildung 30: Phagozytierte apoptotische Körperchen aus mazerierten Oozyten.

DNA wurde mit TOP-RO-3 gefärbt (Mitte weiß und links rot), die TUNEL-Färbung ist weiß (rechts) bzw. grün (links). Im linken Bild wurden die TOP-RO-3- und TUNEL-Färbung über das Phasenkontrastbild gelegt. Die gelben Bereiche in den linken Bildern stellen Überlagerung bzw. Kolokalisation des TO-PRO-3- und des TUNEL-Signals dar. Die apoptotischen Körperchen unterscheiden sich in ihrer Größe, haben jedoch alle gruppiertes Chromatin und sind TUNEL-positiv. Maßstabsbalken 20µm.

2.12. Auch Endodermzellen helfen bei der Phagozytose

In den Mazeraten, die für die TUNEL-Färbungen angefertigt wurden, fielen uns einzelne Endodermzellen mit einer erhöhten Anzahl apoptotischer Vakuolen auf. Es stellte sich daher die Frage, ob die Endodermzellen die Oozyte bei der Phagozytose der Keimzellen, welche ihr Zytoplasma bereits abgegeben hatten, unterstützten. Es wurden Mazerate der verschiedenen Oogenesestadien angefertigt, um die Anzahl der Endodermzellen mit apoptotischen Vakuolen zu bestimmen.

Beim Vergleich weiblicher Tiere vom Stamm AEP, mit den sich vegetativ vermehrenden *Hydra vulgaris* Tieren wurde festgestellt, dass es in den AEP-Tieren eine erhöhte Anzahl von Endodermzellen mit apoptotischen Vakuolen gab (Tab. 1)

	Endodermzellen mit apoptotischen Vakuolen	Endodermzellen ohne apoptotische Vakuolen
AEP	36	64
vulgaris	8	92

Tabelle 1: Vergleich von Endodermzellen in Bezug auf das Vorhandensein von apoptotischen Vakuolen in AEP-Tieren und *Hydra vulgaris*.

Des Weiteren wurden AEP-Tiere des Stadiums 1 (vor der Phagozytose) mit AEP-Tieren des Stadiums 5 (nach der Phagozytose) verglichen. Hier konnte ein deutlicher Anstieg der Endodermzellen mit apoptotischen Vakuolen in den Tieren des Stadiums 5 beobachtet werden (Tab. 2).

	Endodermzellen mit apoptotischen Vakuolen	Endodermzellen ohne apoptotische Vakuolen
AEP, Stadium 1	6	94
AEP, Stadium 5	51	49

Tabelle 2: Vergleich von Endodermzellen in bezug auf das Vorhandensein von apoptotischen Vakuolen in AEP-Tieren zu den Stadien 1 und 5.

Beim optischen Vergleich der apoptotischen Vakuolen in den AEP-Tieren und den *Hydra vulgaris*-Tieren, fiel außerdem auf, dass die Vakuolen in den AEP-Tieren deutlich größer waren (Abb. 31, oben). Sie hatten einen Durchmesser von 10µm und ähnelten den apoptotischen Körperchen in den Oozyten. Die apoptotischen Vakuolen in den *vulgaris*-Tieren waren hingegen nur etwa halb so groß (Abb. 31, unten).

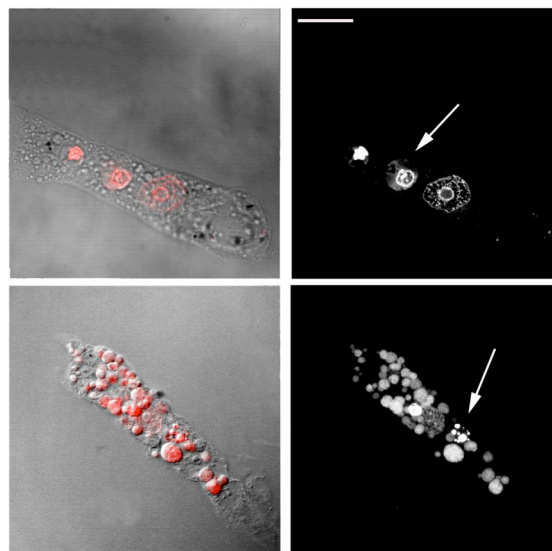


Abbildung 31: Vergleich von apoptotischen Vakuolen in Endodermzellen bei *vulgaris*- und AEP-Tieren.

DNA wurde mit TOP-RO-3 gefärbt (links rot und rechts weiß). Die Pfeile deuten auf die apoptotischen Vakuolen. Obere Reihe: Apoptotische Vakuole innerhalb einer Endodermzelle bei einem weiblichen AEP-Tier im Stadium 5 der Oogenese. Untere Reihe: Apoptotische Vakuole innerhalb einer Endodermzelle bei einem *vulgaris*-Tier. Maßstabsbalken 20 µm.

2.13. Immunfärbung von weiblichen AEP-Tieren

2.13.1. Lokalisation von 14-3-3 während der Oogenese mit Hilfe der Immunfärbung

Die Apoptose spielt während der Oogenese in *Hydra* eine große Rolle. Wie zuvor gezeigt, waren alle drei Arten von apoptotischen Körperchen TUNEL-positiv. Es ist jedoch auch bekannt, dass diese Körperchen erst einige Tage nachdem der Embryo geschlüpft ist, endgültig abgebaut werden. Die Apoptose wird in diesen Zellen also zunächst ausgelöst, dann aber für lange Zeit angehalten (Miller et al., 2000).

In früheren Experimenten gab es erste Hinweise darauf, dass 14-3-3 bei diesem Mechanismus eine Rolle spielen könnte. 14-3-3 war in den Nährzellen sowohl im Zytoplasma als auch im Kern stark angereichert. Das war das erste Mal, dass eine Kernfärbung in einem Differenzierungsprodukt der interstitiellen Zellen zu beobachten war. Bei vorangegangenen Untersuchungen war 14-3-3 bei diesem Zelltyp lediglich im Zytoplasma lokalisiert (Pauly et al., 2003). Es sollte daher näher untersucht werden, ob 14-3-3 als Apoptoseinhibitor bei diesem Mechanismus eine Rolle spielen könnte.

Es wurden Immunfärbungen mit dem anti-14-3-3-Antikörper an ganzen Hydren und an Mazeraten durchgeführt. Als primärer Antikörper wurde der anti-14-3-3-Antikörper K19 von der Firma Santa Cruz verwendet. Er erkennt die Isoformen A und B des *Hydra*-14-3-3-Proteins (Pauly et al., 2003). Als sekundärer Antikörper wurde ein FITC-markierter anti-Kaninchen-Antikörper benutzt. Als Kernfarbstoffe wurden DAPI und TOP-RO-3 eingesetzt.

Alle Keimzelltypen (GCI bis GCIV) waren 14-3-3-positiv. Nicht nur das Zytoplasma, sondern auch der Kern war deutlich gefärbt (Abb. 32). Die Färbung durch den Antikörper war relativ homogen bis auf einige hellere Punkte, welche sich meistens in der Nähe des Kerns befanden.

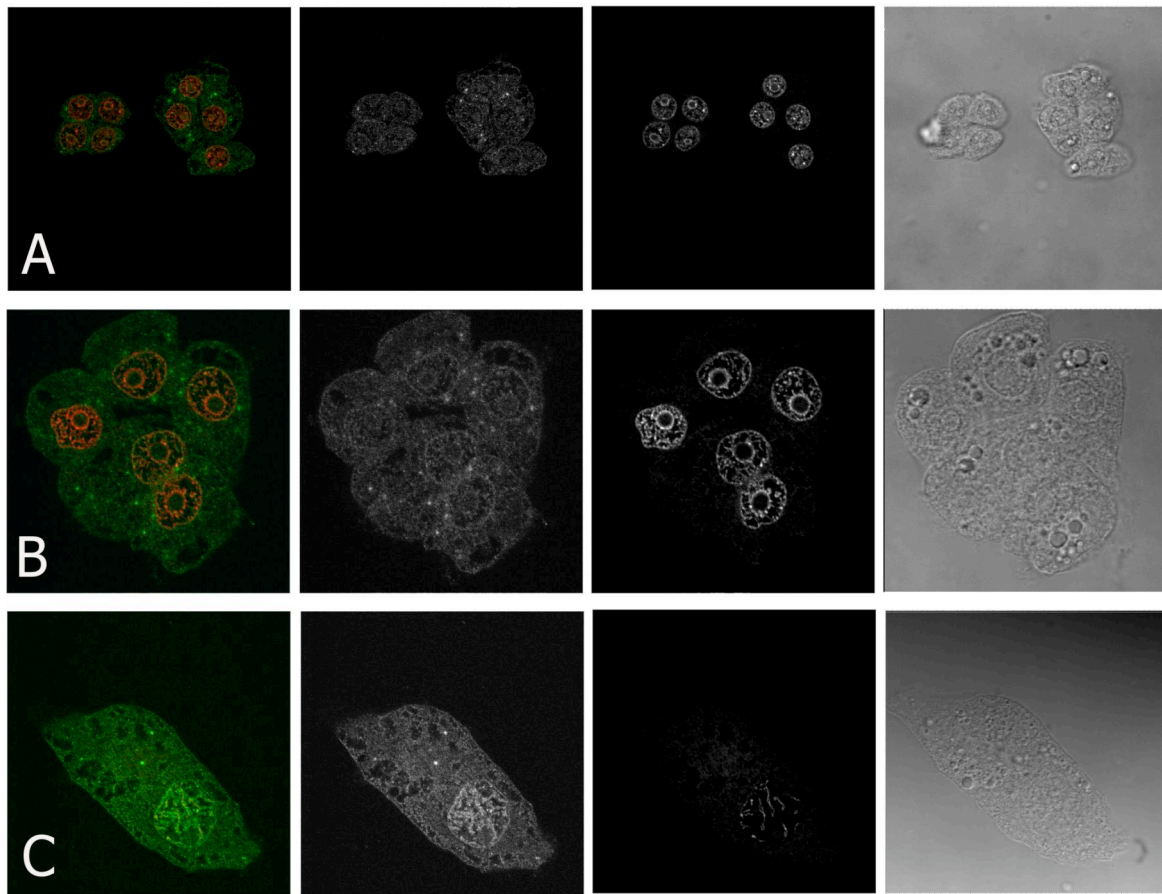


Abbildung 32: Konfokale Bilder von GCI-GCIV-Zellen in mazerierten weiblichen AEP-Tieren, die mit dem anti-14-3-3-Antikörper K19 gefärbt wurden.

Gezeigt ist jeweils links: überlagerte Bilder von einzelnen optischen Schnitten, die man im grünen Kanal (14-3-3-Signal) und in dem roten Kanal (TOP-RO-3-Signal) erhalten hat. Mitte links: nur der grüne Kanal (14-3-3-Verteilung). Mitte rechts: roter Kanal (DNA-Färbung). Rechts: Phasenkontrast. (A) GCI links und GCII rechts. (B) GCIII. (C) GCIV. Maßstabsbalken 20µm.

Bei den GCI bis GCIII war die Färbung im Kern und auch im Zytoplasma von gleicher Intensität. Sobald die Zellen jedoch anfangen, sich zu GCIV und weiter zu Oozyten zu entwickeln, wurden Zellen mit unterschiedlich stark gefärbten Kernen gefunden.

Wurden GCIV in der Nähe von Oozyten gefunden, waren die Kerne der GCIV immer deutlich schwächer gefärbt als die der Oozyten (Abb. 33). Die Kernfärbung der GCIV und der Oozyten war jetzt auch nicht mehr homogen wie bei den GCI bis GCIII sondern auffällig punktförmig.

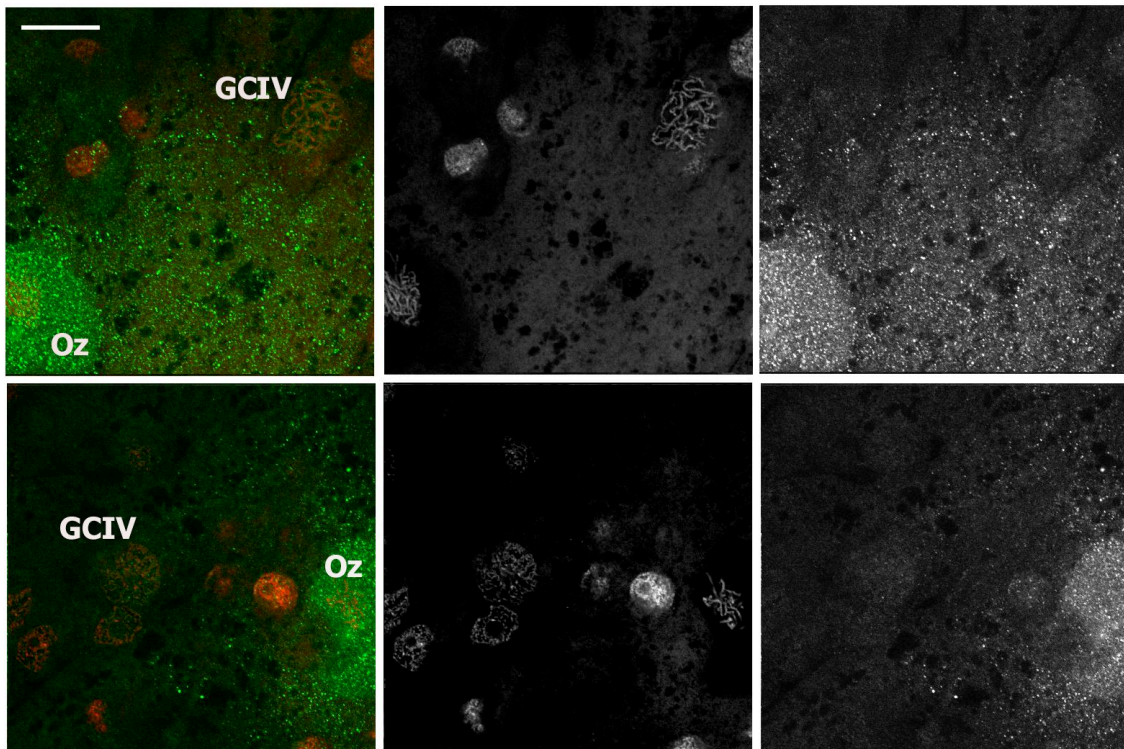


Abbildung 33: Konfokale Bilder von GCIV in der Nähe von Oozyten in ganzen weiblichen AEP-Tieren, die mit dem anti-14-3-3-Antikörper K19 gefärbt wurden.

Gezeigt ist jeweils links: überlagerte Bilder von einzelnen optischen Schnitten, die man im grünen Kanal (14-3-3-Signal) und in dem roten Kanal (TOP-RO-3-Signal) erhalten hat. Mitte: nur der rote Kanal (DNA-Färbung). Rechts: grüner Kanal (14-3-3-Verteilung). In der oberen und der unteren Reihe sind zwei verschiedene Beispiele gezeigt, in denen sich eine GCIV in der Nähe der Oozyte befindet, welche deutlich stärker gefärbt ist als die GCIV. Oz-Oozyte. Maßstabsbalken 20µm.

Wurden innerhalb eines Tieres mehrere Oozyten gefunden, so waren deren Kerne in unterschiedlicher Intensität gefärbt. Neben stark gefärbten Oozytenkernen gab es auch Kerne, welche keinerlei Kernfärbung mehr aufwiesen (Abb. 34). Bei den 14-3-3-negativen Kernen schien es sich stets um degenerierende Kerne zu handeln, welche keine intakte Kernhülle mehr aufwiesen (Abb. 34, Mitte). Degenerierende Kerne, deren Kernhülle noch intakt war, waren hingegen 14-3-3-positiv (Abb. 34, unten).

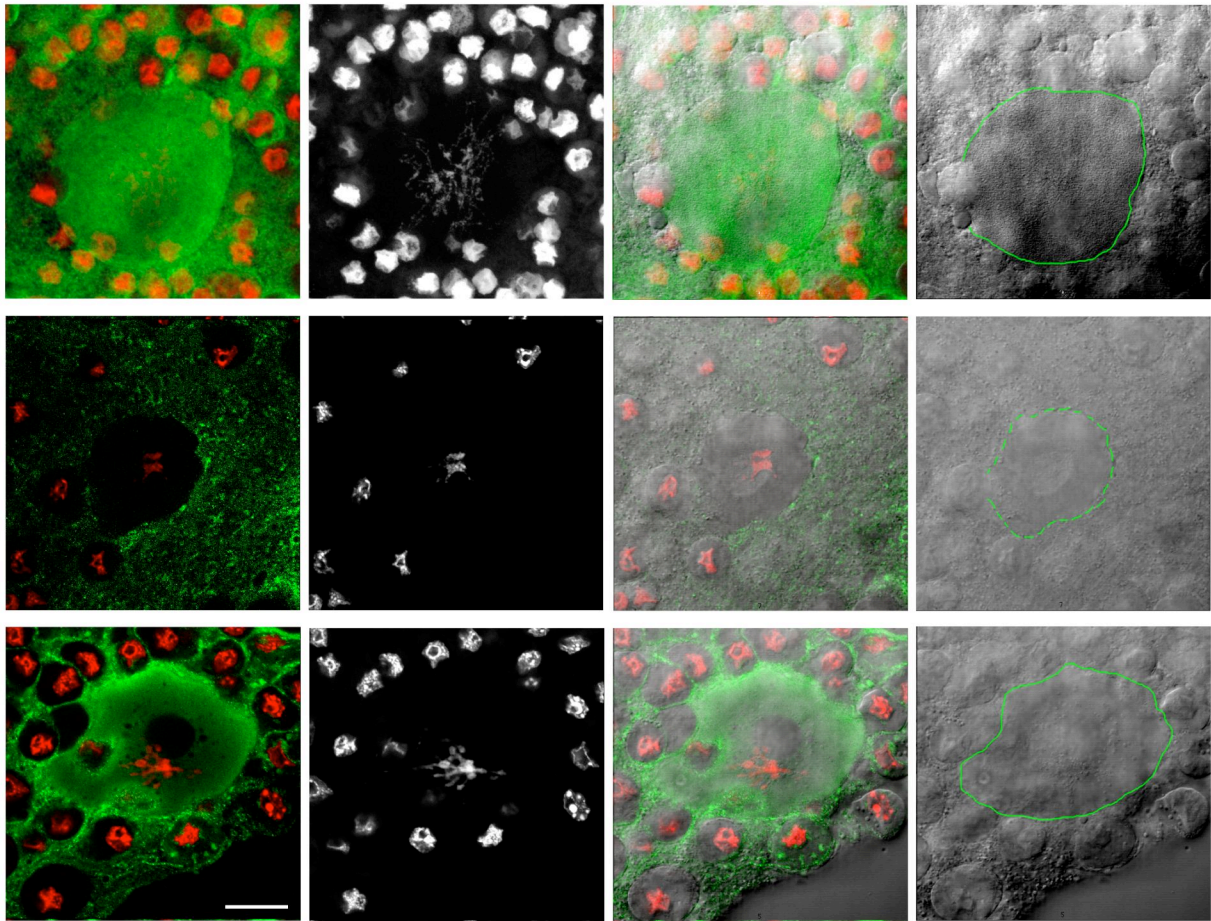


Abbildung 34: Konfokale Bilder von Oozyten in ganzen weiblichen AEP-Tieren, die mit dem anti-14-3-3-Antikörper K19 gefärbt wurden.

Gezeigt ist jeweils links: überlagerte Bilder von einzelnen optischen Schnitten, die man im grünen Kanal (14-3-3-Signal) und in dem roten Kanal (TOP-RO-3-Signal) erhalten hat. Mitte, links: nur der rote Kanal (DNA-Färbung). Mitte, rechts: überlagerte Bilder von einzelnen optischen Schnitten, die man im grünen Kanal (14-3-3-Verteilung), im roten Kanal (DNA-Färbung) und im Phasenkontrast erhalten hat. Rechts: Phasenkontrast; in grün ist jeweils die Hülle des Keimbläschen umrandet. Die Hülle des degenerierenden Keimbläschen in der mittleren Reihe ist gestrichelt dargestellt. Obere Reihe: 14-3-3-positiver Oozytenkern mit intakter Kernhülle. Mittlere Reihe: 14-3-3-negativer, degenerierender Oozytenkern. Die Kernhülle ist nicht mehr intakt. Untere Reihe: 14-3-3-positiver, degenerierender Oozytenkern. Kernhülle ist noch intakt. Maßstabsbalken 20µm.

Auch die kleinen GCIII und GCIV, welche ihr Zytoplasma bereits an die Oocyte abgegeben hatten, sowie die apoptotischen Körperchen, welche von der Oocyte phagozytiert wurden, waren im Kern und im Zytoplasma 14-3-3-positiv (Abb. 35)

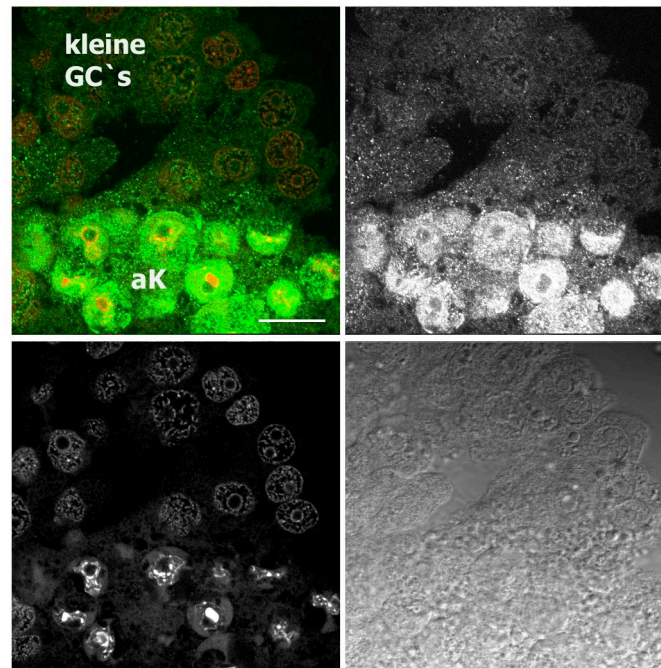


Abbildung 35: Konfokale Bilder von kleinen GCIII und GCIV und apoptotischen Körperchen in ganzen weiblichen AEP-Tieren, die mit dem anti-14-3-3-Antikörper K19 gefärbt wurden.

Gezeigt ist links oben: überlagerte Bilder von einzelnen optischen Schnitten, die man im grünen Kanal (14-3-3-Signal) und in dem roten Kanal (TOP-RO-3-Signal) erhalten hat. Rechts oben: nur der grüne Kanal (14-3-3-Verteilung). Links unten: nur der rote Kanal (DNA-Färbung). Rechts unten: Phasenkontrast. Sowohl die kleinen Keimzellen (GC's) als auch die apoptotischen Körperchen (aK) sind deutlich 14-3-3 positiv. Maßstabsbalken 20µm.

2.13.2. Lokalisation von Vasa während der Oogenese mit Hilfe der Immunfärbung

Aus in-situ-Hybridisierungen an ganzen Tieren war bereits bekannt, dass die beiden *Hydra* vasa Gene (*Cnvas1* und *Cnvas2*) nicht nur von den Zellen der Keimlinie sondern auch von multipotenten I-Zellen und den ektodermalen Epithelzellen des Rumpfes exprimiert werden (Mochizuki et al., 2001).

Die genaue Lokalisation des Proteins innerhalb der verschiedenen Zelltypen war jedoch nicht bekannt. Mit Hilfe von Antikörperfärbungen sollte daher die Lokalisation aufgeklärt werden.

Es wurden Immunfärbungen mit dem anti-vasa-Antikörper an ganzen Hydren und an Mazeraten durchgeführt. Als primärer Antikörper wurde der anti-vasa-Antikörper aus dem Labor von Y.N. Jan verwendet (Hay et al., 1990). Es handelt sich um einen affinitätsgereinigten, polyklonalen Antikörper aus Kaninchen.

Als sekundärer Antikörper wurde ein FITC-markierter anti-Kaninchen-Antikörper benutzt. Als Kernfarbstoffe wurden DAPI und TOP-RO-3 eingesetzt.

Die Färbung mit dem vasa-Antikörper zeigte in den GCI bis GCIII ein typisches Muster, wie es auch aus anderen Spezies (z.B. *Drosophila*) bekannt ist: das gesamte Zytoplasma war, bis auf einige Punkte, homogen markiert. Die Punkte waren dabei besonders stark an der zytoplasmatischen Seite der Kernmembran lokalisiert (Abb. 36).

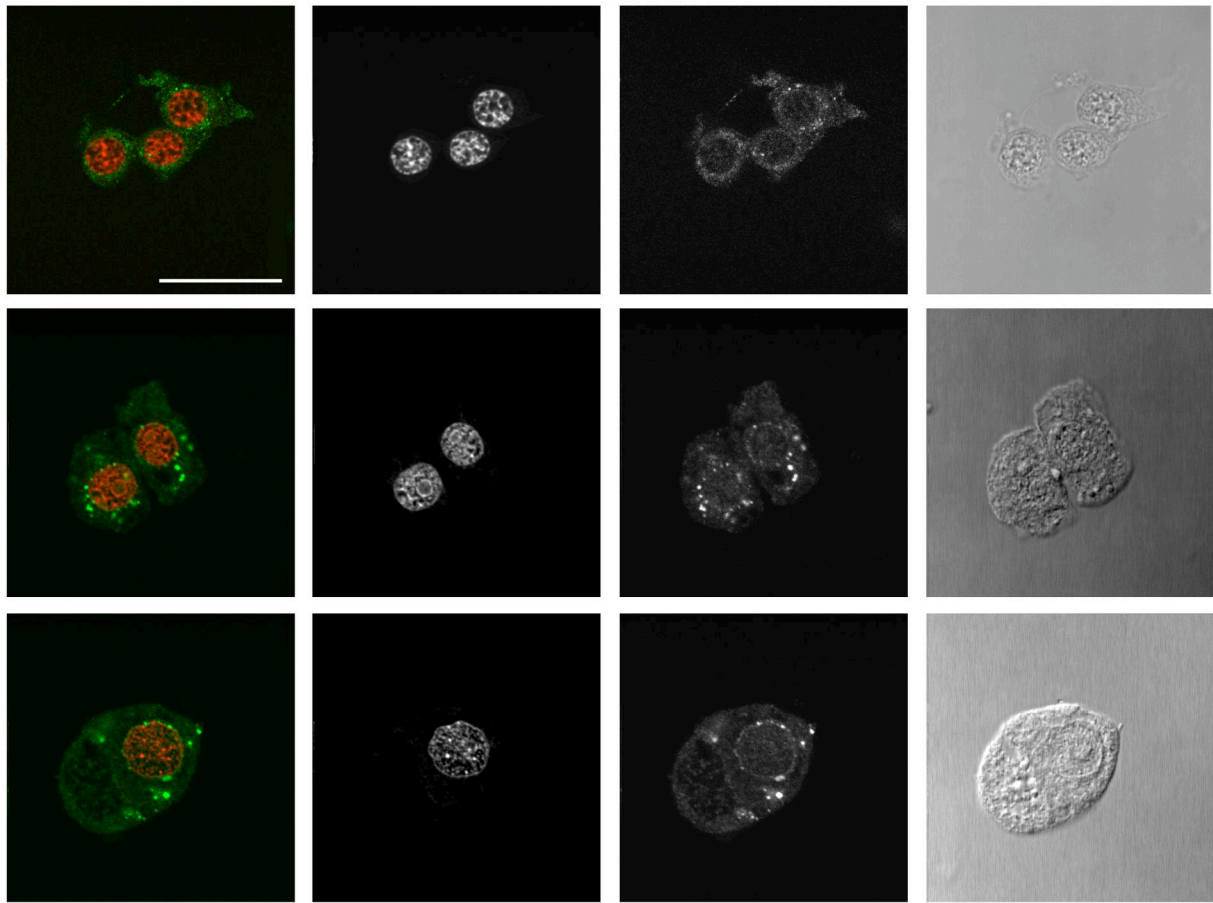


Abbildung 36: Konfokale Bilder von GCI bis GCIII in mazerierten weiblichen AEP-Tieren, die mit dem anti-vasa-Antikörper gefärbt wurden.

Gezeigt ist jeweils links: überlagerte Bilder von einzelnen optischen Schnitten, die man im grünen Kanal (vasa-Signal) und in dem roten Kanal (TOP-RO-3-Signal) erhalten hat. Mitte, links: nur der rote Kanal (DNA-Färbung). Mitte, rechts: nur der grüne Kanal (vasa-Verteilung). Rechts: Phasenkontrast. Obere Reihe: GCI, mittlere Reihe: GCII, untere Reihe: GCIII. Maßstabsbalken 20µm.

Sobald die Differenzierung zu GCIV einsetzte, konnte man zusätzlich eine klare Kernfärbung beobachten (Abb. 37, oben). Auch in der Oozyte blieb die Kernfärbung erhalten (Abb. 37, unten).

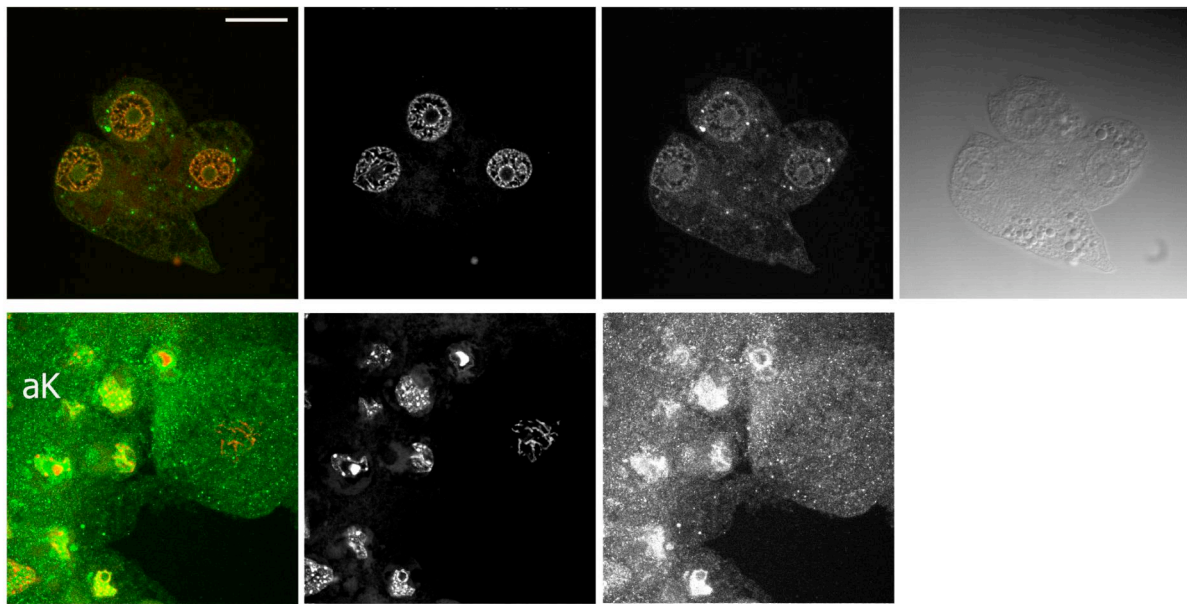


Abbildung 37: Konfokale Bilder von GCIV und einer Oozyte in mazerierten weiblichen AEP-Tieren, die mit dem anti-vasa-Antikörper gefärbt wurden.

Gezeigt ist jeweils links: überlagerte Bilder von einzelnen optischen Schnitten, die man im grünen Kanal (vasa-Signal) und in dem roten Kanal (TOP-RO-3-Signal) erhalten hat. Mitte links: nur der rote Kanal (DNA-Färbung). Mitte rechts: nur der grüne Kanal (vasa-Verteilung). Rechts: Phasenkontrast. Obere Reihe: Die Kernfärbung in den GCIV ist deutlich zu erkennen. Untere Reihe: Oozyte, welche bereits mit apoptotischen Körperchen (aK) angefüllt ist. Sowohl in den apoptotischen Körperchen als auch in der Oozyte selbst ist die Kernfärbung deutlich zu erkennen. Maßstabsbalken 20µm.

Des Weiteren wurden auch Endo- und Ektodermzellen in *Hydra vulgaris*, Stamm Basel betrachtet. Die Ektodermzellen waren deutlich gefärbt und sie zeigten das gleiche Muster wie die Keimzellen (Abb. 38, unten), wohingegen die Endodermzellen nicht gefärbt waren (Abb. 38, oben).

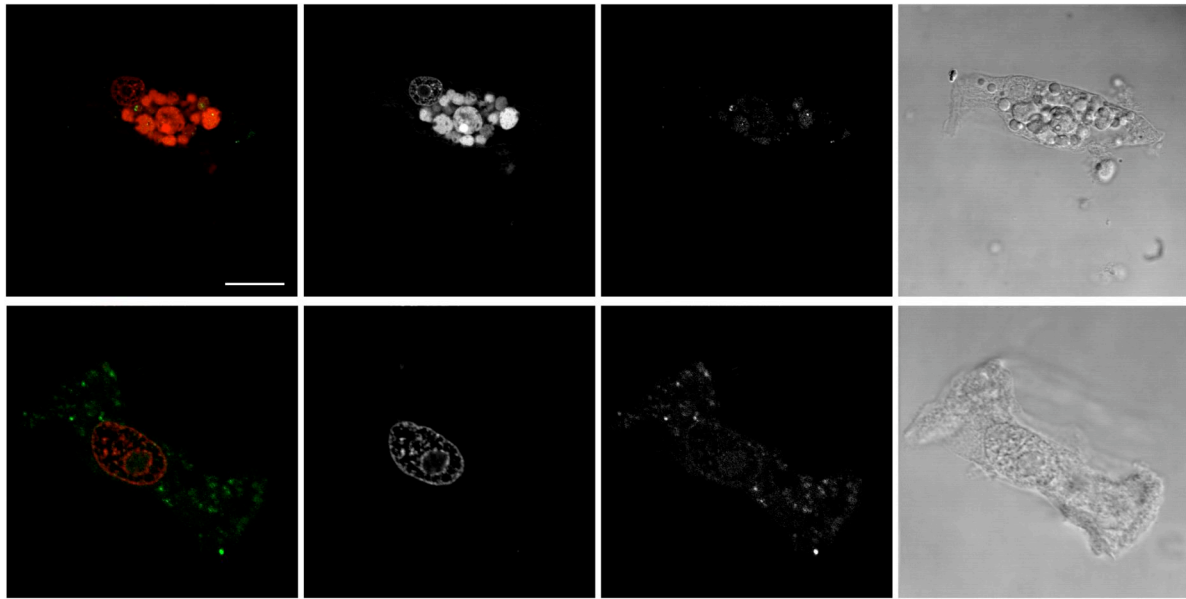


Abbildung 38: Konfokale Bilder von Endo- und Ektodermzellen in mazerierten weiblichen AEP-Tieren, die mit dem anti-vasa-Antikörper gefärbt wurden.

Gezeigt ist jeweils links: überlagerte Bilder von einzelnen optischen Schnitten, die man im grünen Kanal (vasa-Signal) und in dem roten Kanal (TOP-RO-3-Signal) erhalten hat. Mitte, links: nur der rote Kanal (DNA-Färbung). Mitte, rechts: nur der grüne Kanal (vasa-Verteilung). Rechts: Phasenkontrast. Obere Reihe: Endodermzelle, vasa-negativ. Untere Reihe: Ektodermzelle, vasa-positiv. Maßstabsbalken 20µm.

Die Färbung der multipotenten I-Zellen zeigte ebenfalls das gleiche Muster (Abb. 39). Einzelne I-Zellen waren zu 97%, Pärchen von I-Zellen waren zu 99% markiert. I-Zellen in größeren Nestern, welche sich bereits auf dem Weg der Differenzierung befanden, waren hingegen nicht markiert (Abb. 39, unten).

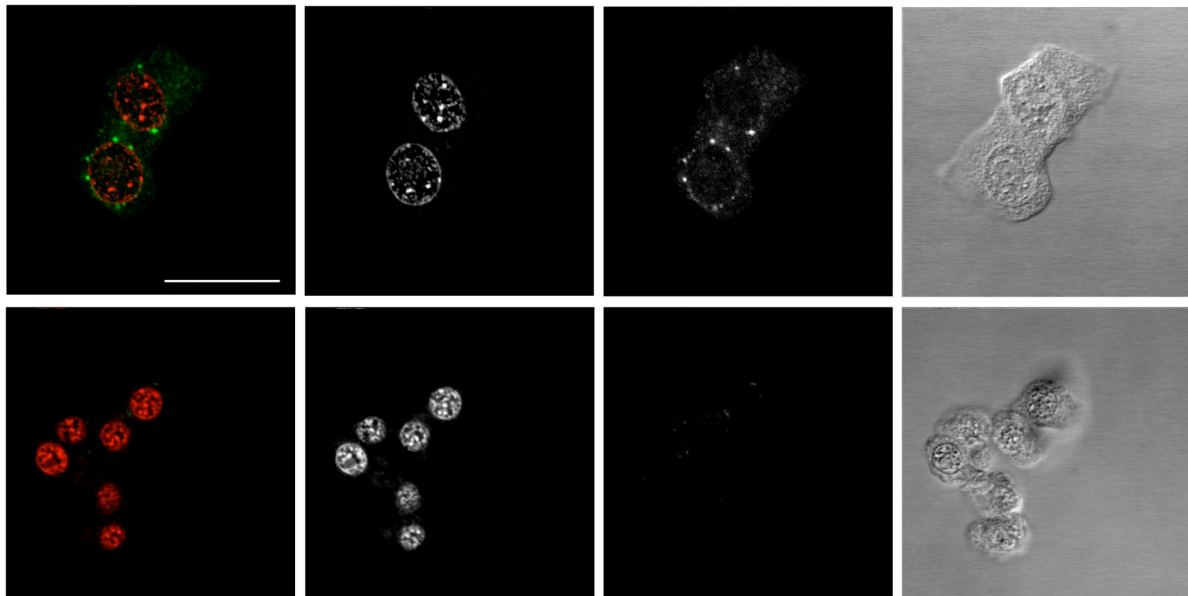


Abbildung 39: Konfokale Bilder von I-Zellen in mazerierten weiblichen AEP-Tieren, die mit dem anti-vasa-Antikörper gefärbt wurden.

Gezeigt ist jeweils links: überlagerte Bilder von einzelnen optischen Schnitten, die man im grünen Kanal (vasa-Signal) und in dem roten Kanal (TOP-RO-3-Signal) erhalten hat. Mitte, links: nur der rote Kanal (DNA-Färbung). Mitte, rechts: nur der grüne Kanal (vasa-Verteilung). Rechts: Phasenkontrast. Obere Reihe: Pärchen von I-Zellen, vasa-positiv. Untere Reihe: Großes I-Zellnest auf dem Weg der Differenzierung, vasa-negativ. Maßstabsbalken 20µm.

3. DISKUSSION

3.1. Zelldifferenzierungs-Schema

Sowohl die Veränderungen in der Zellzusammensetzung des Eiflecks zu verschiedenen Stadien der Oogenese (Abb. 21) als auch die Morphologie der verschiedenen Keimzelltypen (Abb. 18) wiesen darauf hin, dass diese Zellen eine Differenzierungsabfolge bilden. Die Experimente zur DNA-Messung (Abb. 22) und BrdU-Markierung (Abb. 23) konnten diese Vermutung bestätigen.

Man kann daher folgendes Schema zur Keimzelldifferenzierung während der Oogenese in *Hydra* vorschlagen:

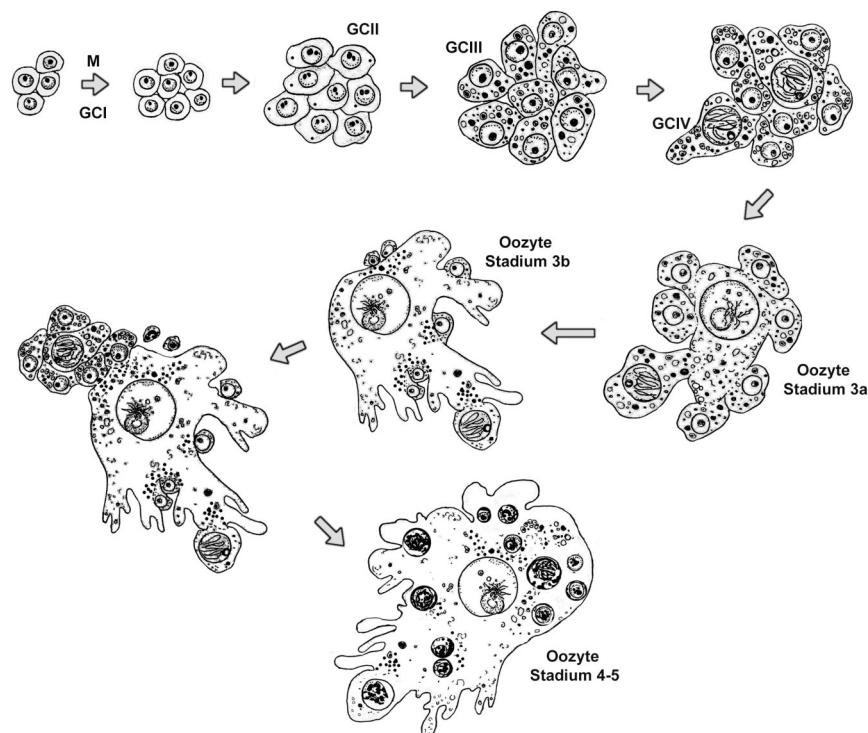


Abbildung 40: Schema zur Keimzelldifferenzierung. Verändert aus (Alexandrova et al., 2005).

Die verschiedenen Differenzierungsstadien der Keimtypen und die Entwicklung der Oozyte sind schematisch dargestellt. M-Mitose.

GCI in kleinen Nestern (Abb. 18) besaßen einen DNA-Gehalt von $2n-4n$ (Abb. 22, rot), wie er typisch ist für proliferierende Zellen. Durch einen BrdU-Puls wurden sie zu 50% markiert. Man kann daraus schlussfolgern, dass sie ihre DNA replizieren, um in die Mitose zu starten. Nach einer terminalen Mitose differenzieren sie zu GCI in großen Nestern. Diese hatten einen DNA-Gehalt von $2n$ (Abb. 22, rot), welcher typisch ist für postmitotische, differenzierende Zellen in *Hydra* (David und Gierer, 1974). Durch einen BrdU-Puls wurden sie kaum markiert. Sie befinden sich in einer prominenten G1-Phase des Zellzyklus, welche für weibliche Keimzellen spezifisch ist. In allen somatischen Zellen und auch in den männlichen Keimzellen von *Hydra* ist die G1-Phase zu vernachlässigen (Campbell und David, 1974; David und Campbell, 1972). Die GCI in großen Nestern erhöhen ihr Zytoplasma- und Kernvolumen und erlangen somit das Aussehen der GCII (Abb. 18), welche mit der premeiotischen DNA-Replikation beginnen. Der DNA-Gehalt der GCII (Abb. 22, blau) und die Tatsache, dass sie durch einen BrdU-Puls zu 80-90% markiert wurden (Abb. 23, rechts), unterstützen diese Idee. Die GCII starten jedoch nicht in die Mitose sondern differenzieren am Ende der S-Phase zu GCIII (Abb. 18), mit einem DNA-Gehalt von $4n$ (Abb. 22, grün) und dem typischen vakuolierten Zytoplasma. Zu Beginn des Stadiums 3a startet 1% der GCIII in die Prophase der Meiose und wird somit zu GCIV (Abb. 18). Nur 2-3 Zellen der GCIV innerhalb eines Eiflecks werden zu Oozyten im Diplotän. Vom Stadium 3a zum Stadium 3b hin wachsen die Oozyten von $100\text{ }\mu\text{m}$ auf $600\text{ }\mu\text{m}$ an (Abb. 19). Dieses Wachstum wird durch den Zytoplasmatransport von benachbarten Keimzellen erreicht (siehe unten, Oozytenwachstum), welche anschließend in die Apoptose gehen (Abb. 29) und von der Oozyte phagozytiert werden (Abb. 30).

3.2. Das Wachstum der Oozyte

Nachdem die Oozyte mit der Meiose begonnen hat, startet sie ihre Wachstumsphase. Das Wachstum der Oozyte erfolgt bei *Hydra* in zwei Schritten:

Während des ersten Schrittes, der mit den Stadien 3a und 3b der Oogenese zusammenfällt, vergrößert sich das Volumen der Oozyte innerhalb von 2 Tagen von 100 µm auf 400 µm im Durchmesser, was einer 50- bis 100-fachen Volumenzunahme entspricht. Die Kerne solcher Oozyten besitzen Chromosomen im Diplotän, welche stark kondensiert sind (Abb. 19). Dies ist ein Hinweis auf geringe transkriptionelle Aktivität (Gruzova und Parfenov, 1993). Die schnelle Zunahme des Zytoplasmavolumens in der Abwesenheit von extensiver transkriptioneller Aktivität lässt vermuten, dass das Zytoplasma der wachsenden Oozyte von den benachbarten Keimzellen importiert wird, wie es für die alimentäre Form der Oogenese typisch ist. Ein Transfer von Zytoplasma zwischen der Oozyte und den Keimzellen wurde bereits von Aizenshtadt (1978) und Honegger et al. (1989) vorgeschlagen. Mit Hilfe elektronenmikroskopischer Untersuchungen konnten sie Verzahnungen zwischen der Oozyte und den umgebenden Zellen und die Anwesenheit von Membranvesikeln, welche die Membran in weiten Bereichen des Zellkontaktes zwischen der Oozyte und den Keimzellen ersetzen, nachweisen (Abb. 41).

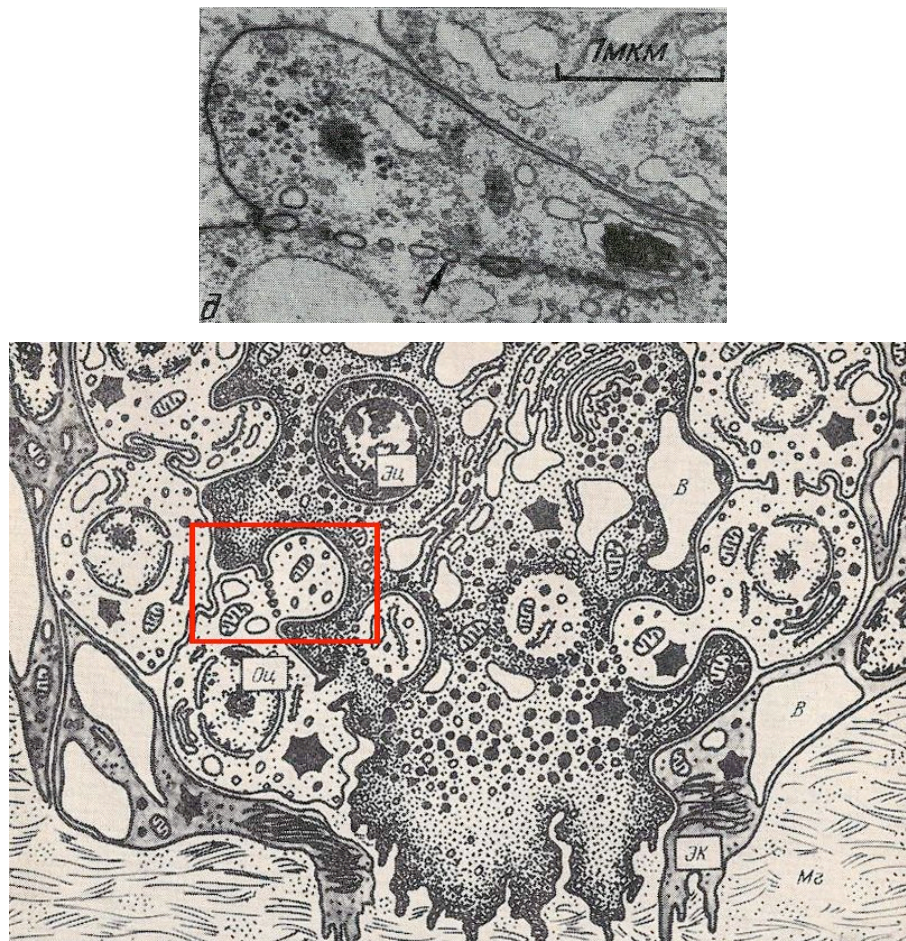


Abbildung 41: Aus Aizenshtadt (1978).

Elektronenmikroskopische Aufnahme von Membranvesikeln, welche die Membran in weiten Bereichen des Zellkontaktes zwischen der Oozyte und den Keimzellen in *Hydra vulgaris* ersetzen.

Oben: Gezeigt ist eine Nährzelle, welche sich in engem Kontakt zur Oozyte befindet. Der Pfeil deutet auf einen Bereich, in welchen die Membran aus Vesikeln besteht. Zum besseren Verständnis ist im unteren schematischen Übersichtsbild der oben gezeigte Bereich rot umrandet. Scale bar 1μm.

Die Tatsache, dass die Keimzellen und die Oozyte zu den Stadien 3a und 3b extrem stark miteinander verbunden waren, lieferte einen weiteren Hinweis auf einen möglichen Zytoplasmatransfer zwischen den beiden Zelltypen. Alle Versuche, die Oozyte von den benachbarten Keimzellen während der Mazeration frei zu bekommen, blieben während dieser Stadien ohne Erfolg. Es ließ sich daher spekulieren, dass die Keimzellen vorübergehend mit der Oozyte fusionieren, um ihr

Zytoplasma abzugeben. Die teilweise Fusion zwischen der Oozyte und den umgebenden GCIII und GCIV konnte schließlich durch zahlreiche Lücken in der Membranfärbung (FM 4-64) in den Bereichen ihres Zellkontaktes bestätigt werden (Abb. 25 und 26). Für die Bestätigung der Lücken in der Membranfärbung stand ein weiterer Antikörper (anti-numb) zur Verfügung, welcher in fixierten ganzen Tieren ebenfalls Membranen färbt (Käsbauer, persönliche Kommunikation). Es konnten zu den Stadien 3a und 3b die gleichen Lücken in der Membranfärbung zwischen der Oozyte und den angrenzenden Keimzellen beobachtet werden (Abb. 42).

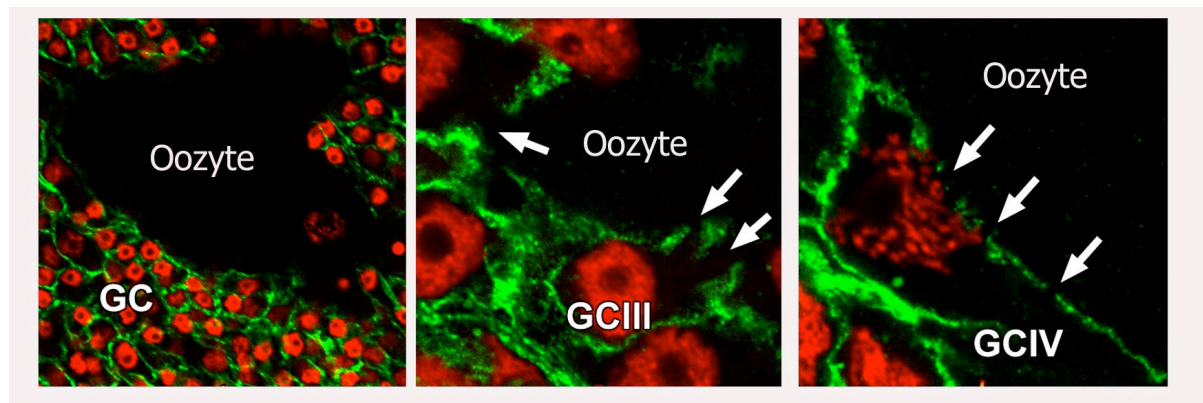


Abbildung 42: Konfokale Bilder von Keimzellen und Oozyten in ganzen weiblichen AEP-Tieren, die mit dem anti-numb-Antikörper gefärbt wurden.

Die Bilder zeigen Bereiche des Kontaktes zwischen Keimzellen (GC) und Oozyten in verschiedenen Eiflecken. Membranen sind mit dem anti-numb-Antikörper gefärbt (grün), Kerne mit TOP-RO-3 (rot). Die Pfeile deuten auf Bereiche, in denen die Membranfärbung deutlich fehlte. Das linke Bild gibt einen Überblick über eine Oozyte und angrenzende Keimzellen. Bei höherer Vergrößerung (Mitte und links) werden Lücken in der Membranfärbung deutlich (Pfeile). Mitte: Lücken in der Membranfärbung zwischen der Oozyte und GCIII. Links: Lücken in der Membranfärbung zwischen der Oozyte und einer GCIV.

Es wurde auch versucht, Zytoskelettstrukturen in den Bereichen der Zellfusion, wie sie aus *Drosophila* bekannt sind (Ringkanäle), nachzuweisen. Jedoch konnten weder durch die Färbungen mit Tubulin- noch mit Aktin-Antikörpern spezifische Strukturen nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

In tierischem Gewebe kommt es nur in speziellen Fällen zur Fusion von Zellen. Beispiele hierfür sind die Fusion von Spermien und Eiern während der Befruchtung oder die Fusion von Myoblasten mit differenzierenden Myotuben (Dworak und Sink, 2002). Für letzteren Vorgang wurden bei *Drosophila* mehrere Transmembranproteine entdeckt, welche von den fusionskompetenten Zellen exprimiert werden. Der Prozess der Fusion scheint so polarisiert zu sein, dass die Myoblasten als Sender und die Myotuben als Empfänger fungieren, indem sie unterschiedliche Moleküle auf ihrer Zellmembran exprimieren. Auch während der Oogenese von *Hydra* gibt es eine solche Polarität von Zellen: die Keimzellen können mit der Oozyte fusionieren, aber nicht miteinander (Abb. 25 und 26).

Der zweite Schritt des Wachstums (Stadium 4 der Oogenese) ist durch die Zunahme des Ooplasmavolumens über die Phagozytose der apoptotischen Keimzellen durch die Oozyte charakterisiert (Abb.20). Die phagozytierten apoptotischen Körperchen verweilen bis zum Schlüpfen des Polypen im Zytoplasma und werden erst dann abgebaut (Gruzova, 1956; Martin et al.,1997).

3.3. Fusion von Oozyten

Zu den Stadien 3a und 3b konnten innerhalb eines Eiflecks jeweils 2-3 Oozyten im Diplotän gefunden werden. Auch im Stadium 4 wurden oft zwei Oozyten gefunden, während zu den Stadien 5, 6 und 7 stets nur noch eine Oozyte gefunden werden konnte. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen wäre die Fusion der wachsenden Oozyten zu einer Zelle, sobald sie miteinander in Kontakt kommen. Unterstützt wird diese Interpretation durch das Auftreten von 1-2 degenerierenden meiotischen Kernen in den Oozyten zu den Stadien 5, 6 und 7 der Oogenese. Solche Kerne befanden sich nicht innerhalb phagozytischer Vakuolen sondern lagen frei im Ooplasma (Abb. 27).

Die Fusion von Oozyten ist bei der Oogenese von Cnidariern nicht ungewöhnlich. Sie konnte für einen anderen Hydrozoen *Tubularia crocea* (Boelstreli, 1975) und für einen Vertreter der Archiannelida *Dinophilus gyrotilatus* (Grün, 1972) gezeigt werden. Aizenshtadt (1978) und Zihler (1972) haben aufgrund elektronenmikroskopischer Untersuchungen ein ähnliches Schema für *Hydra* vorgeschlagen. Ihre Daten wurden jedoch als unzureichend betrachtet, um dieser Möglichkeit zuzustimmen oder sie abzulehnen (Honegger et al., 1989). In neueren Untersuchungen konnten Miller et al. (2000) zeigen, dass ein Eifleck mehr als eine potentielle Oozyte enthält, auch wenn in einem intakten Eifleck letztendlich nur eine überlebt. Wurde ein Eifleck in zwei Hälften geschnitten, entwickelte sich aus beiden Hälften eine Oozyte. Eine mögliche Erklärung für diese Resultate könnte die Fusion der Oozyten zum Ende ihrer Differenzierung sein.

3.4. Apoptose der Keimzellen

Nachdem die Oozyte aufgrund des Zytoplasmatransportes von GCIII und GCIV wächst (Stadium 3b), wird in den Keimzellen Apoptose ausgelöst. Die Induktion der Apoptose ist notwendig, damit die „ausgesaugten“ Zellen phagozytiert werden können. Daher sind nicht nur die phagozytierten Zellen apoptotisch sondern auch schon die frei liegenden GCIII und GCIV mit wenig Zytoplasma (Abb. 29). Die Apoptose wird also schon nach dem Transfer des Zytoplasmas ausgelöst. Diese Schlussfolgerungen stimmen mit vorangegangenen Arbeiten von Zihler (1972) und Honegger et al. (1989) überein, welche auf EM-Beobachtungen basieren.

Die verschiedenen Stadien der Differenzierung der Keimzellen, welche von der Oozyte ausgesaugt und apoptotisch gemacht wurden, resultiert in dem Auftreten von verschiedenen Typen von phagozytischen Vakuolen im Ooplasma. Der TUNEL Test auf mazerierten einzelnen Oozyten konnte zeigen, dass die Kerne aller drei Typen von phagozytierten Zellen TUNEL-positiv sind (Abb. 30). Die vorangegangenen Versuche, den Test durchzuführen, waren nicht erfolgreich (Technau et al., 2003). Dies ist darauf zurückzuführen, dass die apoptotischen Körperchen innerhalb des Ooplasmas auf eine spezielle Art verpackt sind.

Die Apoptose in den apoptotischen Körperchen läuft erst in der späten Embryogenese weiter. Nach dem Schlüpfen des Polypen betreten die apoptotischen Körperchen den lysosomalen Weg und werden schnell abgebaut. Warum bleiben die apoptotischen Körperchen in einem angehaltenen Zustand der Apoptose unangetastet bis zum Ende der embryonalen Entwicklung und werden so vor dem weiteren Abbau geschützt? Eine mögliche Erklärung ist die Tatsache, dass die Oozyte sowohl in ihrer Kraft als auch in der Zeit eingeschränkt ist. In einer limitierten Zeit muss sie ihr Wachstum beenden, die meiotischen Teilungen vollziehen, durch das Ektoderm brechen, befruchtet werden und die Furchungsteilungen sowie andere Schritte der frühen Embryonalentwicklung beenden.

Eine weitere mögliche Erklärung wäre, dass die apoptotischen Körperchen dem geschlüpften Polypen als Nahrung dienen. In *Hydra* werden mehrere tausend Keimzellen von der Oozyte phagozytiert. Diese Zellkörper stellen eine beträchtliche

biosynthetische Masse dar, welche der Embryo nach dem Schlüpfen verbraucht. Das könnte einen selektiven Vorteil bedeuten.

3.5. Vergleich der Oogenese in *Hydra*, *Caenorhabditis* und *Drosophila*

Die grundlegenden Mechanismen der alimentären Oogenese, wie sie für *Caenorhabditis* und *Drosophila* typisch ist, sind bereits in dem Cnidarier *Hydra* vorhanden. Daher gibt es viele Gemeinsamkeiten (Abb. 43):

Die Nährzellen, welche bei der alimentären Oogenese die Hauptmasse an RNA und Proteinen synthetisieren, stammen bei allen von den Keimzellen ab. Vor ihrer Differenzierung durchlaufen die Keimzellen in allen drei Spezies eine premeiotische S-Phase. In *Hydra* initiieren einige dieser Zellen (GCIV) die Meiose, in *Drosophila* sind es nur zwei (DeCuevas et al., 1997) und bei *Caenorhabditis* erreichen alle Kerne das Pachytän. Die Nährzellen geben in allen drei Fällen ihr Zytoplasma an die Oozyte ab, bevor sie in die Apoptose gehen und phagozytiert werden (*Hydra*: Honegger et al., 1989; Littlefield, 1991; Miller et al., 2000; Zihler, 1972; *Drosophila*: Mahajan-Miklos und Cooley, 1994; Nezis et al., 2000; *Caenorhabditis*: Gumienny et al., 1999). Auch wenn die grundlegenden Mechanismen übereinstimmen, gibt es wichtige Unterschiede (Abb. 43):

Der erste liegt in der Anzahl der Nährzellen, welche die Oozyte in ihrem Wachstum unterstützen. Diese unterschiedliche Anzahl der Keimzellen spiegelt sich in der unterschiedlichen Größe der Oozyten wider. Die ausgewachsene Oozyte von *Hydra* hat eine Größe von 600 µm, während die Oozyte von *Drosophila* 150 µm misst und die von *Caenorhabditis* ca. 50 µm im Durchmesser hat. Die verschiedenen Größen der Oozyten reflektieren das Verhältnis der Volumina von 1700:27:1. Dies wiederum stimmt in groben Zügen mit der Menge an Nährzellen überein, welche mit ihrem Zytoplasma zum Wachstum der Oozyte beisteuern. Die Größe der Oozyte ist also proportional zur Anzahl der besteuernden Zellen.

Ein weiterer Unterschied liegt in dem Schicksal der Zellen, nachdem die Apoptose initiiert wurde. Die Zellkörper werden bei *Drosophila* und *Caenorhabditis* (Foley und Cooley, 1998; Gumienny et al., 1999; Nezis et al., 2000) von somatischem Gewebe phagozytiert. Bei *Hydra* hingegen werden die apoptotischen Nährzellen von der Oozyte selber phagozytiert und bleiben bis zum Schlüpfen des Polypen im

Zytoplasma (Martin et al., 1997; Technau et al., 2003; Zihler, 1972). Was ist die biologische Signifikanz für das Umschließen der apoptotischen Zellen durch die Oozyte? Tausende von apoptotischen Zellen müssen entfernt werden, damit die Oozyte weiter wachsen kann. Obwohl Epithelzellen in der Lage sind apoptotische Keimzellen zu phagozytieren (Tab. 1 und 2, Abb. 31), sind die meisten zu weit weg und somit nicht in genügender Anzahl vorhanden, um diese Funktion zu erfüllen. Der einzige Kandidat um Platz zu schaffen, ist die Oozyte selbst.

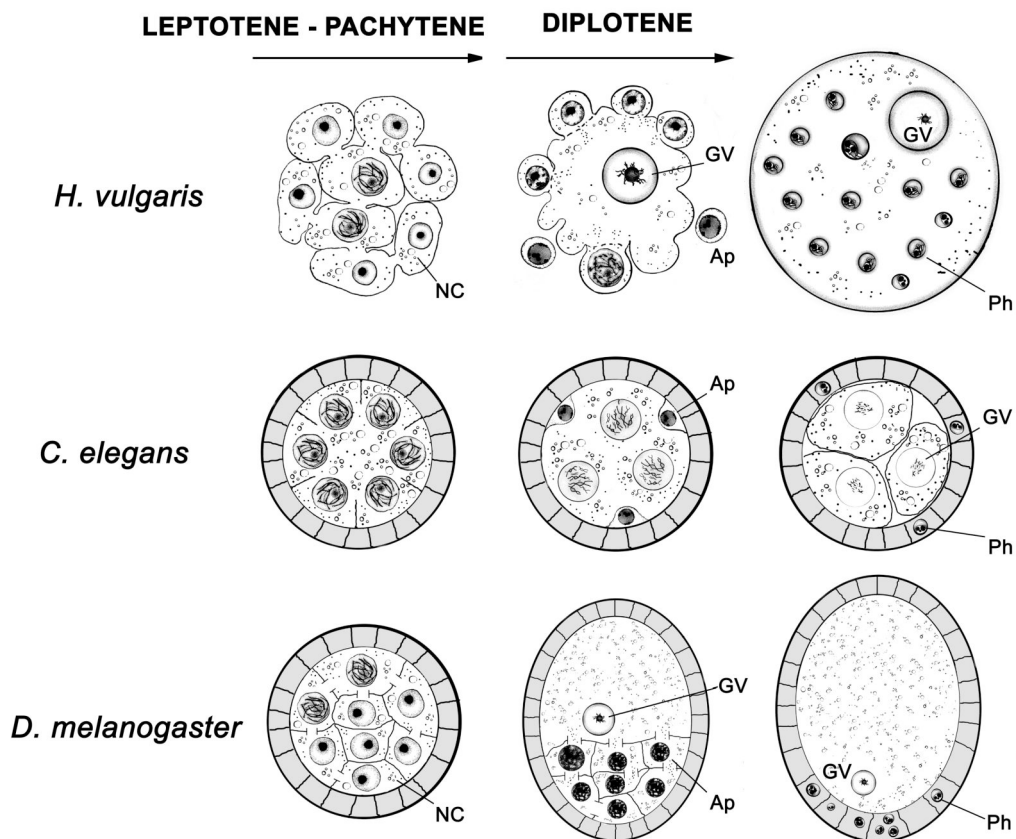


Abbildung 43: Schematischer Vergleich der Oogenese von *Hydra*, *Caenorhabditis* und *Drosophila*.

Besonders wird auf die Rolle der Nährzellen im Verlauf der Oogenese eingegangen. Ap-apoptotische Zelle, GV-Keimbläschen, NC-Nurse-Zelle, Ph-phagozytisches Körperchen.

3.6. Rolle der Epithelzellen während der Oogenese

Es scheint, dass die Position der Keimzellen in bezug auf die umgebenden Epithelien eine entscheidende Rolle beim weiteren Differenzierungsweg der Zellen spielen könnte. Die Tatsache, dass die Akkumulation der Keimzellen in einem Bereich des Körpers stattfindet, welcher durch die Anwesenheit von spezialisierten, hoch pigmentierten endodermalen Zellen charakterisiert ist, wurde schon früher beschrieben (Miller et al., 2000). Weiterhin zeigten elektronenmikroskopische Untersuchungen Kontakte zwischen den endodermalen Zellen und der Oozyte (Aizenshtadt, 1978). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Keimzellen, welche in die frühe Prophase der Meiose starten, oft in Kontakt mit der Mesogloea gefunden werden können (Abb. 18).

Des Weiteren scheint der Kontakt mit den ektodermalen Epithelzellen wichtig für die Oozyte zu sein, damit sie mit der Phagozytose der benachbarten Zellen beginnen kann. Erst nachdem die Oozyte in Kontakt mit dem Ektoderm gekommen ist, und das Keimbläschen seine Position von der Mitte der Zelle zur Oberfläche hin geändert hat, erscheinen die phagozytischen Vakuolen im Ooplasma. Es könnte also sein, dass die Epithelzellen, welche den Eifleck umgeben, die Rolle von Follikelzellen übernehmen, welche sich dann später in der Evolution beim follikulären Typ der Oogenese entwickelt haben. Ein weiterer Hinweis auf diese Theorie ist die Tatsache, dass ein Teil der Endodermzellen bei der Phagozytose der apoptotischen Keimzellen mithilft (Tab. 1 und 2, Abb. 31).

Aktuelle Studien haben gezeigt, dass die Signalgebung über die Follikelzellen bei der Differenzierung der Oozyte von *Drosophila* eine wichtige Rolle spielt (Ray und Schüpbach, 1996). Die Rolle der Follikelzellen bei der MAPK-Aktivierung in den Keimzellen von *C. elegans* konnte klar gezeigt werden (Miller et al., 2003; Corrigan et al., 2005; Whitten et al., 2007).

Die Signalwege der Epithelzellen zu den Keimzellen in *Hydra* werden hoffentlich die Themen von weiteren Studien sein, welche die Oogenese von *Hydra* betreffen.

3.7. Die Verteilung von *Hydra* 14-3-3-Proteinen in Keimzellen und Oozyten

Vorangegangene Ergebnisse deuten darauf hin, dass 14-3-3-Proteine in *Hydra* sowohl bei der Regulation des Nahrungsumsatzes eine Rolle spielen könnten, als auch bei der Phagozytose apoptotischer Zellen (Pauly et al., 2003; Pauly et al., 2007; Diplomarbeit Schade 2002). Bei Hungerbedingungen ändern 14-3-3-Proteine ihre Lokalisation und reichern sich in den Kernen der Epithelzellen an. Des Weiteren findet man auch eine erhöhte 14-3-3-Konzentration in phagozytischen Vakuolen. Da die Oogenese von *Hydra* einen Prozess darstellt, bei dem Phagozytose zum Zwecke der Nahrungs- und Energiebereitstellung zuerst für die Oozyte selber und später für den geschlüpften Embryo genutzt wird, stellte sich die Frage, ob 14-3-3-Proteine in *Hydra* dabei eine Rolle spielen könnten. In Tausenden von Keimzellen wird Apoptose eingeleitet, damit diese von der Oozyte phagozytiert werden können. Die Apoptose wird dann aber über Wochen oder Monate hinweg bis zum Schlüpfen des Embryos angehalten, und die Zellen werden erst vollständig abgebaut, nachdem der Embryo geschlüpft ist.

Die Immunfärbungen demonstrierten ganz klar eine hohe Konzentration von 14-3-3 in den Keimzellen (Abb. 32). GCI bis GCIV waren im Zytoplasma überwiegend homogen gefärbt. Es gab jedoch auch einige hellere Punkte, die sich stets in der Nähe des Kerns befanden. Auffällig war, dass in allen Keimzelltypen eine deutliche Kernfärbung zu beobachten war, während in sich vegetativ vermehrenden Hydren in den interstitiellen Zellen nie eine Kernfärbung beobachtet wurde. Auch die „kleinen“ GCIII und GCIV mit wenig Zytoplasma und die von der Oozyte phagozytierten apoptotischen Körperchen waren stark 14-3-3-positiv (Abb. 35).

Während die GCI bis GCIII relativ homogen und in gleicher Intensität gefärbt waren, fand man bei den GCIV Zellen, deren Kerne unterschiedlich stark gefärbt waren. Außerdem war die Färbung jetzt nicht mehr homogen sondern eher punktförmig. Bei den Immunfärbungen in den ganzen Tieren fiel auf, dass die Kerne der GCIV, welche

sich in der Nähe einer Oozyte befanden, immer deutlich schwächer gefärbt waren als der Oozytenkern (Abb. 33). Aufgrund dieser Ergebnisse könnte man spekulieren, dass die hohe Konzentration von 14-3-3 in den Keimzellen für die Arretierung der Apoptose von Bedeutung ist. Die antiapoptotische Funktion von 14-3-3-Proteinen wurde in der Literatur ausführlich beschrieben. Es gibt verschiedene Signalwege, in denen 14-3-3 eingreift. Dazu gehören die Bindung und zytoplasmatische Sequestrierung von Transkriptionsfaktoren der Forkhead-Familie, die Bindung von proapoptotischen BAD, die Assoziation mit A20 und ASK1 sowie die Regulation von MAPK-Kaskaden (van Hemert et al. 2001).

Es könnte auch sein, dass sowohl die metabolische Aktivität als auch die Speicherung von Nahrungsstoffen für den später schlüpfenden Embryo ebenfalls durch eine Bindung an 14-3-3 reguliert werden.

Eine zweite Beobachtung die während der Oogenese in *Hydra* im Zusammenhang mit der Lokalisation von 14-3-3-Proteinen gemacht wurde, betraf die Oozyte. Auch bei den Oozyten war die Färbung eher punktförmig und man fand Kerne, welche mit unterschiedlicher Intensität gefärbt waren (Abb. 34). Neben stark gefärbten Oozytenkernen gab es auch welche, bei denen die Färbung gänzlich fehlte. Bei letzteren handelte es sich immer um degenerierende Kerne, welche keine intakte Kernhülle mehr aufwiesen (Abb. 34, Mitte). Diese Kerne schienen abgebaut zu werden, was die Hypothese stützen würde, dass 14-3-3 den Abbau bzw. die Apoptose hemmt.

3.8. Die Verteilung des Vasa-Proteins in Keimzellen und Oozyten

Das Vasa-Protein ist bei vielen Spezies eine Komponente des Keimplasmas und der Nuage. Innerhalb des Keimplasmas ist es dabei besonders in den Keimgranula angereichert. Die Produkte der vasa-verwandten Gene befinden sich daher in allen Zellen der Keimlinie und spielen eine Rolle bei deren Bildung und Erhaltung (Lasko und Ashburner, 1988; Ikeneshi und Tanaka, 1997; Kuznicki et al., 2000). Auch in *Hydra* wurden zwei vasa-verwandte Gene entdeckt (Mochizuki et al., 2001). Durch in-situ-Hybridisierungen wurde festgestellt, dass sie nicht nur von Keimzellen, sondern auch von ektodermalen Epithelzellen und von multipotenten I-Zellen exprimiert werden. Weiterhin entdeckten Noda und Kanai (1977), dass es in den multipotenten Stammzellen und den Keimzellen von *Hydra* auch Keimgranula gibt. Es sollte nun herausgefunden werden ob die *Hydra*-Vasa-Proteine innerhalb der Zellen auch in diesen Granula lokalisiert sind.

Die Ergebnisse der in-situ-Hybridisierungen von Mochizuki et al. (2001) konnten mit Hilfe der Immunfärbungen bestätigt werden. Vasa wird von allen Keimzelltypen und der Oozyte exprimiert. Die Färbung war im Zytoplasma vorwiegend homogen, bis auf einige Punkte auf der zytoplasmatischen Seite der Kernmembran (Abb. 36). Diese punktförmige Verteilung weist darauf hin, dass Vasa bei *Hydra* auch in den von Noda und Kanai (1977) beschriebenen Keimgranula lokalisiert sein könnte.

Zusätzlich war in den GCIV und der Oozyte auch eine Kernfärbung zu beobachten (Abb. 37). Die Lokalisation von Vasa in den Kernen der Keimzellen ist auch aus *Drosophila* bekannt, eine Färbung des Oozytenkerns kann in *Drosophila* jedoch nicht beobachtet werden (Lasko und Ashburner, 1990). Warum dies bei *Hydra* der Fall ist, kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht geklärt werden.

Zusätzlich zu den Zellen der Keimlinie waren auch die ektodermalen Epithelzellen aus der Region des Eiflecks (Abb. 38, unten) sowie die multipotenten I-Zellen (Abb. 39, oben) gefärbt.

Das Muster der Färbung war das gleiche wie in den Keimzellen. Endodermzellen (Abb. 38, oben) und I-Zellen in großen Nestern (Abb. 39, unten) waren hingegen nicht gefärbt.

Das Vorkommen von Vasa in somatischen Zellen konnte bisher nur in totipotenten somatischen Stammzellen (Neoblasten) von Planariern (Shibata et al., 1999) und in bestimmten somatischen Zellen innerhalb des *Xenopus*-Embryos (Ikenishi und Tanaka, 2000) beobachtet werden. Bei den Neoblasten von Planariern handelt es sich um undifferenzierte Zellen, welche eine spezifische Struktur, den sogenannten „chromatoid body“ enthalten, welcher den Keimgranula aus anderen Spezies zu entsprechen scheint. Der chromatinartige Körper findet sich außer in den Neoblasten auch in den Keimzellen.

Die Ergebnisse bei Planariern und *Xenopus* deuten darauf hin, dass die Expression von Vasa auch in die Aufrechterhaltung des totipotenten Status von somatischen Zellen involviert ist. Die Tatsache, dass die multipotenten interstitiellen Stammzellen von *Hydra* auch Vasa exprimieren, unterstützt diese Idee. Außerdem können die ektodermalen Zellen des Rumpfes auch als undifferenzierter Zelltyp betrachtet werden, da diese Zellen erst weiter differenzieren, sobald sie in das Kopf- oder Fußgewebe einwandern.

4. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Die Oogenese in Hydra stellt einen hochkomplexen Vorgang dar. Tausende von interstitiellen Zellen proliferieren in der Region des Eiflecks und bilden am Ende der Oogenese eine reife Oozyte. In dieser Arbeit konnten wichtige Fragen in bezug auf die komplexe Morphologie innerhalb des Eiflecks geklärt werden.

1. Die Zellzusammensetzung des Eiflecks zu verschiedenen Stadien der Oogenese.

Es konnten vier verschiedene morphologische Klassen von Keimzellen definiert (GCI-GCIV) und ihr Differenzierungsweg beschrieben werden. Aus GCI-Zellen werden GCII-Zellen, welche später zu GCIII-Zellen differenzieren. Einige GCIII Zellen treten in die frühe Prophase der Meiose ein und erlangen das Aussehen von GCIV-Zellen. Innerhalb eines Eiflecks erreichen 2-3 der GCIV-Zellen das Diplotän-Stadium der meiotischen Prophase und entwickeln sich zu Oozyten. Nur eine dieser Oozyten beendet die meiotischen Teilungen und bildet somit die reife Oozyte.

2. Zytoplasmatransfer zwischen den Keimzellen und der Oozyte.

Die Keimzellen fusionieren vorübergehend mit der Oozyte, um ihr Zytoplasma abzugeben. Sie können deshalb auch mit Nährzellen verglichen werden, welche in anderen Organismen die Oozyte "ernähren". Nach der Fusion rezellularisieren die Zellen, zeigen Anzeichen von Apoptose und werden von der Oozyte phagozytiert.

3. Apoptose der Keimzellen nach dem Zytoplasmatransfer.

GCIII- und GCIV-Zellen, welche ihr Zytoplasma bereits an die Oozyte abgegeben haben sowie bereits von der Oozyte phagozytierte Zellen sind apoptotisch.

4. Innerhalb eines Eiflecks kann es zunächst mehrere Oozyten geben.

Ein Eifleck besitzt mehrere potenzielle Oozyten, auch wenn in einem intakten Eifleck nur eine überlebt. Am Ende der Differenzierung fusionieren die Oozyten miteinander, so dass nur eine Oozyte pro Eifleck gebildet wird. Nur ein Kern überlebt in solchen fusionierten Oozyten und vollzieht die Meiose, die anderen Kerne werden eliminiert.

5. 14-3-3 spielt eine Rolle bei der arretierten Form der Apoptose in den Keimzellen.

Das Protein ist in den Keimzellen stark angereichert und es ist besonders auffallend im Kern lokalisiert. Nur in degenerierenden Oozytenkernen, die keine intakte Kernmembran mehr aufweisen, ist das 14-3-3-Protein nicht mehr im Kern nachzuweisen.

6. Das Vasa-Protein wird von allen undifferenzierten Zelltypen exprimiert.

Ektodermale Epithelzellen des Rumpfes, multipotente I-Zellen und Keimzellen exprimieren Vasa. Daher könnte Vasa auch bei *Hydra* eine Rolle bei der Bildung und Erhaltung von Stammzellen spielen, indem es deren undifferenzierten Status aufrecht erhält. Die punktförmige Verteilung des Proteins in den oben genannten Zelltypen lässt vermuten, dass es bei *Hydra* auch in den Keimgranula lokalisiert ist.

5. MATERIAL UND METHODEN

5.1. Material und Bezugsquellen

5.1.1. Chemikalien

BrdU	Roche
BSA	Roth
Calciumchlorid	Sigma
Chromalaun	Serva
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck
Essigsäure	Roth
Ethanol	Roth
Fish-Gelatine	Sigma
Formaldehyd	Roth
Formamid	Roth
Glycerol	Serva
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumhydrogenphosphat	Roth
Magnesiumsulfat	Fluka
Methanol	Merck
Natriumchlorid	Roth
Natriumcitrat	Roth
Natriumkarbonat	Roth
Natronlauge	Merck
Paraformaldehyd	Sigma
Salzsäure	Roth
Trinatriumcitrat	Merck
Tris-Base	Gibco BRL
Triton-X-100	Merck

Tween 20

Urethan

Vectashield

Merck

Serva

Vector Lab.

5.1.2. Antikörper

5.1.2.1. Erstantikörper

Antikörper	Firma	Wirt	polyklonal / monoklonal	Verdünnung	Fixierung in ganzen Tieren
Anti 14-3-3 (K19)	Santa Cruz	Kaninchen	polyklonal	1:50 – 1:100	Lavdowsky
Anti vasa	Eigenproduktion (Hay et al., 1990)	Kaninchen	polyklonal	1:100	4% PFA
Anti BrdU	Roche	Maus	monoklonal	1:10	1%PFA/ 50% EtOH

5.1.2.2. Zweitantikörper

Antikörper	Firma	Wirt	Konjugat	Verdünnung
FITC anti rabbit	Sigma	Kaninchen	FITC	1:100
Goat anti mouse	Molecular Probes	Ziege	Alexa 488	1:400

5.1.3. andere Farbreagenzien

DAPI

Sigma

Der Farbstoff wurde 1:1000 (0,5 µg/ml) in PBS verdünnt, Inkubation für 3 min.
Exzitation 345 nm, Emission 458 nm.

SYTO16

Molecular Probes

Der Farbstoff wurde 1:200 (10µM) in HM verdünnt (zur Injektion in den Gastralraum und zur Inkubation ganzer Tiere), Inkubation für 20 min.
Exzitation 488 nm; Emission 518 nm

TOP-RO-3

Molecular Probes

Der Farbstoff wurde 1:1000 in PBS verdünnt (1µM), Inkubation für 3 min.

FM4-64

Molecular Probes

Der Farbstoff wurde 1:100 (50µM) in HM verdünnt, Inkubation für 20 min.
Verdünnung bei Injektion in den Gastralraum: 500µM
Exzitation 515 nm; Emission 640 nm

BrdU

Roche

Der Farbstoff wurde (5mM) in HM verdünnt, Inkubation 45 min.

5.1.4. Puffer und Lösungen

Puffer / Lösung	Zusammensetzung
Blockierlösung für Immunfärbung	1g BSA (1%) 0,1% Triton: 1 ml 10% Triton X-100 in 100 ml 1fach PBS lösen
Chromalaun/Gelatine Lösung	1 ml Fish-Gelatine 45 mg Chromalaun ($\text{CrK}(\text{SO}_4)_2 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$) → bis 450 ml mit d H_2O auffüllen
8% Formaldehyd	1 ml Formaldehyd 3,6 ml H_2O
50% Formamid/1 fach SSC	50 ml Formamid in 50 ml 1xSSC
70% Formamid/1 fach SSC	70 ml Formamid in 30 ml 1xSSC
Immobilisierungslösung	4% Fish-Gelatine und 1% Urethan in HM
Lavdowsky Fixierung	5 ml Formaldehyd 2 ml Essigsäure 25 ml EtOH 20 ml H_2O
Mazerationslösung	1 ml Glycerol 1 ml Essigsäure 13 ml H_2O
1fach PBS	40 ml 25fach PBS 960 ml dd H_2O
25fach PBS	180 g NaCl 217,7 g KH_2PO_4 43,5 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ in 1l dd H_2O auflösen → erst auf 800 ml auffüllen, dann pH auf 7,3 einstellen (mit NaOH)
Permeabilisierungslösung	0,5% Triton X-100: 1ml 10% Triton X-100 in 20 ml 1fach PBS lösen
Permeabilisierungslösung für TUNEL Test	0,1% Triton X-100 0,1% Natriumcitrat in PBS
4% PFA/1fach PBS	4g PFA 100 ml PBS → auf 60°C erhitzen bis aufgelöst
Relaxiermedium (2% Urethan)	2g Urethan in 100 ml HM lösen

SSC	150mM NaCl 15 mM Trinatriumcitrat pH 7,0
Stock Solution 20% Paraformaldehyd	20g PFA 4 ml Na ₂ CO ₃ (0,1M) → bis 100 ml mit ddH ₂ O auffüllen → auf 60°C erhitzen und rühren bis gelöst
0,1% Tween	10 µl Tween 20 9,99 ml H ₂ O
10% Triton X-100/1fach PBS	45 ml 1fach PBS 5 ml Triton X-100
Waschlösung für Immunfärbung ganzer Hydren	0,1% Triton in 1fach PBS

5.1.5. Medien

Hydramedium	0,1 mM KCl 1 mM NaCl 0,1mM MgSO ₄ 1 mM Tris 1 mM CaCl ₂
-------------	---

5.1.6. Kits

In situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein

Hoffmann La Roche

Kit für die Detektion und Quantifizierung von Apoptose auf dem Level von einzelnen Zellen. Während der Apoptose kommt es zu Brüchen innerhalb der DNA Stränge. Bei der TUNEL Reaktion werden die Brüche identifiziert, indem man freie 3`OH Enden mit modifizierten Nukleotiden in einer enzymatischen Reaktion markiert. In diesem Fall sind die UTP`s mit Fluorescein markiert. Die Analyse erfolgt dann mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie.

5.1.7. sonstige Materialien

Superfrost Plus Objektträger

Menzel Gläser

5.1.8. Mikroskope

- Leica TCS SP konfokales Laser Scanning Mikroskop Leica
Microsystems
→ ausgestattet mit einem Ölimmersions Plan-Apochromat 100 /1.4 NA Objektiv

- Leica Stereomikroskop MZ12 Leica
Microsystems
→ ausgestattet mit Fluoreszenzmodul und GFP Filter (480/40 nm), sowie einer Digitalkamera (ProgRes14)
→ Die Software kommt von Jenoptic L.O.S. GmbH, es handelt sich um die Version 1.5 (Leica DM5000 B)

- Epifluoreszenzmikroskop Axioplan, Zeiss
→ ausgestattet mit Plan-Apochromat 5X/0.2 und Plan-Apochromat 40X/o.65 Objektiven und einem Filter für FITC

- Leitz Dialux 20 Fluoreszenzmikroskop Leitz
→ ausgestattet mit einem Photometer (Leitz MPV Kompakt)

5.1.9. *Hydra* Kultur und Induktion von Oogenese

- Kultivierung der *Hydren* erfolgte bei 18°C in HM
- regelmäßige Fütterung mit frisch geschlüpften *Artemia* nauplii

- Stammkulturen von AEP Tieren 2 mal die Woche füttern
- Auslösung der Gametogenese: Änderung des Futterregimes
 - Tiere eine Woche hungern
 - dann 1-2 mal die Woche füttern
- 10-14 Tage nach Änderung des Futterregimes beginnt die Oogenese
- Befruchtung der Eier durch männliche AEP Tiere (Stamm PA2, Martin et al. 1997)

5.2. Immunhistochemie

5.2.1. Gelatine Objektträger

- Objektträger mit EtOH waschen
- für einige sek in Chromalaun/Gelatine Lösung halten
- bei 65°C ÜN trocknen

5.2.2. Mini-Mazeration

- Tiere für 2 min in 2 % Urethan entspannen
- die Region des Eiflecks mit Hilfe eines Skalpells ausschneiden, d.h. Kopf und Fuß ober- bzw. unterhalb des Eiflecks abschneiden
- die isolierte Region in einen Tropfen Mazerationlösung überführen
- für 5 min bei 18°C (im Hydraraum) inkubieren
- durch vorsichtiges Schütteln und Klopfen des Behältnisses (kleine Petrischale) werden die Zellen bis zum gewünschten Grad voneinander getrennt
- anschließend werden die Zellen durch die Zugabe eines Tropfens 8% Formaldehyd fixiert
- die Zellsuspension auf einen gelatinisierten Objektträger überführen
- zu einem 1 cm x 1 cm großem Quadrat ausstreichen
- für ca. 1 h an der Luft trocknen lassen

5.2.3. Immunfärbung ganzer Hydren

- die Antikörper werden in Blockinglösung verdünnt
 - Hydren in kleine Petrischalen umsetzen
 - 3x mit HM waschen
 - HM absaugen und durch 2% Urethan in HM ersetzen
 - 2 min inkubieren: die Tiere entspannen sich
 - Fixierungsmedium hinzugeben
- A) Lavdowsky
- B) Methanol (100%), bei -20°C aufbewahren
 - C) 2% PFA / 1fach PBS
 - D) 1% PFA / 50% EtOH
 - E) 4% PFA / 1fach PBS
- 1 h bei 4°C inkubieren
 - 3 x für 20 min in 1fach PBS waschen
 - wahlweise 15 min in Permeabilisierungslösung inkubieren
 - 20 min in Blockinglösung inkubieren
 - Tiere in 96 well Platte überführen
 - Blockinglösung absaugen und durch 1. Antikörper (80-100 μl) ersetzen
 - ÜN bei 4°C inkubieren
 - 3 x 15 min mit PBS + 0,1% Triton (200 μl) waschen
 - PBS + 0,1% Triton absaugen und durch 2. Antikörper (80 μl) ersetzen
 - 90 min im Dunkeln bei RT inkubieren
 - 3 x 15 min mit PBS + 0,1% Triton (200 μl) waschen
 - PBS + 0,1% Triton absaugen
 - mit Kernfärber gegenfärben
- A) 3 min mit TOP-RO-3 (1:1000 in PBS verdünnen)
- B) 20 min mit SYTO-16 (1:200 in PBS verdünnen)
 - C) 3 min mit DAPI (1:1000 in PBS verdünnen)

- kurz mit 1fach PBS waschen
- darin auf den Objektträger aufbringen
- überschüssiges PBS absaugen
- in 1em Tropfen Vectashield einbetten
- Deckglas aufbringen
- mit Nagellack versiegeln
- Objekte bei 4°C im Dunkeln aufbewahren

5.2.4. Mazeration und Immunfärbung von mazerierten Hydren

- die Antikörper werden in Blockinglösung verdünnt
- 10 Hydren mit 10 Tropfen Mazerationslösung versetzen
- 30 min bei 32°C inkubieren
- Becher aufklopfen, bis sich das Gewebe in Einzelzellen gelöst hat
- 10 Tropfen 8% Formaldehyd hinzugeben
- 25 µl Mazerat auf einen mit 0,1% Tween betropften, mit Gelatine beschichteten Objektträger geben
- zu einem 1 cm x 1 cm großen Quadrat ausstreichen
- ca. 1h an der Luft trocknen lassen
- 10 min in 70% EtOH waschen
- 3 x 10 min mit PBS waschen
- 20 min mit Blockinglösung inkubieren
- 1. Antikörper aufbringen (15 µl)
- Deckglas aufbringen
- in feuchter Kammer ÜN bei 4°C im Kühlschrank inkubieren
- 3 x 10 min mit PBS waschen
- 2. Antikörper aufbringen (15 µl)

- Deckglas aufbringen
- in feuchter Kammer für 90 min im Dunkeln bei RT inkubieren
- 3 x 10 min mit PBS waschen
- mit Kernfärber gegenfärben
- 3 min mit TOP-RO-3 oder DAPI (100 µl, 1:1000 in PBS verdünnen)
- kurz mit 1fach PBS waschen
- überschüssiges PBS absaugen
- in 1em Tropfen Vectashield einbetten
- Deckglas aufbringen
- mit Nagellack versiegeln
- Objekte bei 4°C im Dunkeln aufbewahren

5.2.5. TUNEL Test

- der TUNEL Test wird mit dem „in situ cell death detection kit“ von Hofmann La Roche durchgeführt, welches Fluorescein markierte UTP`s benutzt
- Tiere für 3 min in 2% Urethan entspannen
- die Region des Eiflecks wird mit Hilfe der Mini-Mazeration (siehe oben) isoliert
- getrocknete Objektträger 2x in PBS waschen
- die Permeabilisierung der Zellen erfolgt auf Eis (4°C):
- Inkubation für 5 Min in 0,1% Triton X-100 und 0,1% Natriumzitat in PBS
- 2x mit PBS waschen
- Region um die Probe herum trocknen
- 50µl der TUNEL Reaktionsmischung hinzu geben
- Objektträger für eine h bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubieren
- 3x mit PBS waschen

- mit Kernfärber gegenfärben
- 3 min mit TOP-RO-3 oder DAPI (100 µl; 1:1000 in PBS verdünnen)
- kurz mit PBS waschen
 - in einem Tropfen Vectashield einbetten
 - Deckglas aufbringen
 - mit Nagellack versiegeln
 - Objekte bei 4°C im Dunkeln aufbewahren

5.2.6. Membranfärbung mit dem Farbstoff FM4-64

- die Membranfärbung wird an lebenden Tieren durchgeführt
- 1 µl FM4-64 (500 µM)/ SYTO16 (10µM) wird mit Hilfe eines Mikro-Haematokrit Röhrchens in den Gastralraum des Tieres injiziert
- Tiere 10 bis 20 min in 50 µM FM4-64/ 10 µM SYTO16 inkubieren
- zum Scannen am Mikroskop müssen die Tiere in einen Tropfen Immobilisierungslösung überführen werden

5.2.7. Messung des DNA Gehaltes

- der DNA Gehalt der Kerne wird mit Hilfe des DNA spezifischen Fluorochroms DAPI bestimmt
- Präparate mit der Methode der Mini-Mazeration (siehe oben) herstellen
- kurz mit PBS waschen

- mit Kernfärber gegenfärben
- 3 min mit DAPI (1:1000 in PBS verdünnen)
- die Messung der Fluoreszenz wird an einzelnen Zellen vorgenommen:
- mit einem Leitz Dialux 20 Fluoreszenzmikroskop, ausgestattet mit einem Photometer (Leitz MPV Kompakt)
- Nervenzellen als Standard für einen diploiden DNA Gehalt (2n) nehmen (David und Gierer, 1974)

5.2.8. BrdU Markierung von ganzen Tieren

- 0,5 µl einer 5µM BrdU-Lösung mit Hilfe eines Mikro-Haematokrit Röhrchens in den Gastralraum der Hydren injizieren
- Tiere 45 min bei 18°C (im Hydraraum) inkubieren
- für 3 min in 2% Urethan entspannen
- für 1h bei RT in 1% PFA / 50% EtOH fixieren
- 3x 10 min in PBS waschen
- 20 min in 0,5% Triton X-100 in PBS permeabilisieren
- 2x 10 min in PBS waschen
- für 10 min bei RT in 0,1N HCl in H₂O inkubieren
- 2x 15 min in 2x SSC waschen
- ÜN bei 4°C in 50% Formamid in SSC inkubieren
- 70% Formamid in SSC im Wasserbad auf 73°C erhitzen
- Tiere für 3 min inkubieren
- für 3 min in 70% EtOH auf Eis
- für 3 min in 96% EtOH auf Eis
- kurz in 70% EtOH auf Eis

- 10 min in PBS bei RT
 - 15 min in Blockinglösung inkubieren
 - ÜN bei 4°C mit dem 1. Antikörper (anti BrdU) in einer feuchten Kammer inkubieren
 - 3x 15 min mit PBS waschen
 - für 1h bei 37°C mit dem 2. Antikörper (Alexa 488) in einer feuchten Kammer inkubieren
 - 3x 10 min mit PBS waschen
 - mit Kernfärber gegenfärben
- 3 min mit TOP-RO-3 (1:1000 in PBS verdünnen)
- kurz mit 1fach PBS waschen
 - überschüssiges PBS absaugen
 - in 1em Tropfen Vectashield einbetten
 - Deckglas aufbringen
 - mit Nagellack versiegeln
 - Objekte bei 4°C im Dunkeln aufbewahren

5.2.9. BrdU Markierung von Mazeraten

- 0,5 µl einer 5µM BrdU-Lösung mit Hilfe eines Mikro-Haematokrit Röhrchens in den Gastralraum der Hydren injizieren
- Tiere 45 min bei 18°C (im Hydraraum) inkubieren
- Eiflecke mit Hilfe der Mini-Mazeration isolieren
- Präparate auf Superfrost Plus Objektträgern ÜN trocknen
- 15 min Methanol bei RT
- 3x 10 min mit PBS waschen
- 20 min in 0,5% Triton X-100 in PBS permeabilisieren
- kurz mit PBS waschen

- für 1h bei 37°C in 2N HCl inkubieren
- 3x 10 min in PBS waschen
- 15 min in Blockinglösung inkubieren
- ÜN bei 4°C mit dem 1. Antikörper (anti BrdU) in einer feuchten Kammer inkubieren
- 3x 15 min mit PBS waschen
- für 1h bei 37°C mit dem 2. Antikörper (Alexa 488) in einer feuchten Kammer inkubieren
- 3x 10 min mit PBS waschen
- in 1em Tropfen Vectashield einbetten
- Deckglas aufbringen
- mit Nagellack versiegeln
- Objekte bei 4°C im Dunkeln aufbewahren

5.2.10. konfokale Mikroskopie

- Serien von lichtoptischen Schnitten an einem konfokalen Leica Mikroskop machen
- Fluorochrome werden mit Lasern sichtbar gemacht:
 - A) Argon Laser (Erregbarkeit bis zu einer Wellenlänge von 488 nm) mit Emissionsfilter 510-540 nm für FITC und SYTO16
 - B) Helium-Neon Laser (Erregbarkeit bis zu einer Wellenlänge von 633 nm) mit Emissionsfilter 640-760 nm für TOP-RO-3 und FM4-64
- die beiden Fluorochrome und das Phasenkontrastbild (Transmissionsfilter) aufeinanderfolgend scannen
- Auflösung der Bilder 512 x 512 Pixel
 - Pixelgröße variiert von 195 bis 49 nm abhängig vom Zoomfaktor

- axialer Abstand zwischen den optischen Schnitten: 280nm bei Zoomfaktor 4 und 1 μm bei Zoomfaktor 1
- um ein verbessertes Verhältnis vom Signal zum Hintergrund zu bekommen wird jedes Bild aus dem Durchschnitt von 4 erfolgreichen Scans berechnet
- die 8 bit Graustufen Einzelkanalbilder in einem RGB Bild übereinander legen
→ jedem Kanal eine falsche Farbe zuordnen
- Bilder mit Hilfe von Photoshop 5.5 und in ImageJ 1.32j bearbeiten

6. LITERATURVERZEICHNIS

Aizenshtadt, T.B. (1975). Investigation of oogenesis in *Hydra*. Communication I. Ultrastructure of interstitial cells at early stages of their transformation into oocytes. Sov. J. Dev. Biol. 5, 9-19.

Aizenshtadt, T.B. (1978). Oogenesis in *Hydra*: III. The growth and fusion of the oocytes. Ontogenez 9, 115-123.

Alexandrova, O., Schade, M., Böttger, A., David, C.N. (2005). Oogenesis in *Hydra*: Nurse cells transfer cytoplasm directly to the growing oocyte. Dev. Biol. 281, 91-101.

Allis, C.D., Underwood, E.M., Caulton, J.H., Mahowald, A.P. (1979). Pole cells of *D. melanogaster* in culture. Normal metabolism, ultrastructure and functional capabilities. Dev. Biol. 69(2), 451-465.

Amikura, R., Kashikawa, M., Nakamura, A., Kobayashi, S. (2001). Presence of mitochondria-type ribosomes outside mitochondria in germ plasm of *Drosophila* embryos. Dev. Biol. 98(16), 9133-9138.

Arama, E., Agapite, J., Steller, H. (2003). Caspase activity and a specific cytochrome C are required for sperm differentiation in *Drosophila*. Dev. Cell 4, 687-697.

Ashley, T. (2000). An integration of old and new perspectives of mammalian meiotic sterility. Results Probl. Cell Differ. 28, 131-173.

Ayllon, V., Cayla, X., Garcia, A., Roncal, F., Fernandez, R., Albar, J.P., Martinez, C., Rebollo, A. (2001). Bcl-2 targets proteins phosphatase 1 alpha to Bad. J. Immunol. 166(12), 7345-7352.

- Baum, J.S., St. George, J.P., McCall, K. (2005). Programmed cell death in the germline. *Semin. Cell Dev. Biol.* 16, 245-259.
- Binkert, F. (2006). Zytogenetische Diagnostik vor und nach einer Behandlung von Unfruchtbarkeit. *Journal für Fertilität und Reproduktion*; 16(4) [Ausgabe für Schweiz]:7-12.
- Bode, H.R. (1996). The interstitial cell lineage of hydra: a stem cell system that arose early in evolution. *J. Cell Sci.* 109, 1155-1164.
- Boelstreli, U. (1975). Notes on oogenesis in *Tubularia crocea* Agassiz (Athecata, Hydrozoa). *Pubb. Stn. Zool. Napoli*, 53-66.
- Bosch, T.C. und David, C.N. (1984). Growth regulation in Hydra: relationship between epithelial cell cycle length and growth rate. *Dev. Biol.* 104, 161–71.
- Breitwieser, W., Markussen, F.H., Horstmann, H., Ephrussi, A. (1996). Oskar protein interaction with Vasa represents an essential step in polar granule assembly. *Genes Dev.* 10, 2179–2188.
- Cahill, C.M., Tzivion, G., Nasrin, N., Ogg, S., Dore, J., Ruvkun, G., Alexander-Bridges, M. (2001). Phosphatidylinositol 3-kinase signalling inhibits DAF-16 DNA binding and function via 14-3-3-dependent and 14-3-3-independent pathways. *J Biol. Chem.* 276(16), 13402-13410.
- Cashio, P., Lee, T.V., Bergmann, A. (2005). Genetic control of programmed cell death in *D. melanogaster*. *Semin. Cell Dev. Biol.* 16(2), 225-235.
- Cavaliere, V., Taddei, C., Gargiulo, G. (1998). Apoptosis of nurse cells at the late stages of oogenesis. *Dev. Genes Evol.* 208, 106–112.

Chai, J., Yan, N., Huh, J.R., Wu, J.W., Li, W., Hay, B.A., Shi, Y. (2003). Molecular mechanism of Reaper-Grim-Hid-mediated suppression of DIAP1-dependent Dronc ubiquitination. *Nat. Struct. Biol.* 10, 892–898.

Chaudhri, M., Scarabel, M., Aitken, A. (2003). Mammalian and yeast 14-3-3 isoforms form distinct patterns of dimers in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 300(3), 679-685.

Cheeks, R.J., Canman, J.C., Gabriel, W.N., Meyer, N., Strome, S., Goldstein, B. (2004). *C. elegans* PAR proteins function by mobilizing and stabilizing asymmetrically localized protein complexes. *Curr. Biol.* 14(10), 851-862.

Chiang, C.W., Harris, G., Ellig, C., Masters, S.C., Subramanian, R., Shenolikar, S., Wadzinski, B.E., Yang, E. (2001). Protein phosphatase 2A activates the proapoptotic function of BAD in interleukin-3-dependant lymphoid cells by a mechanism requiring 14-3-3 dissociation. *Blood* 97(5), 1289-1297.

Church, D.L., Guan, K.L., Lambie, E.J. (1995). Three genes of the MAP kinase cascade, *mek-2*, *mpk-1/sur-1* and *let-60 ras*, are required for meiotic cell cycle progression in *Caenorhabditis elegans*. *Development* 121, 2525–2535.

Cikala, M., Wilm, B., Hobmayer, E., Böttger, A., David, C.N. (1999). Identification of caspases and apoptosis in the simple metazoan *Hydra*. *Curr. Biol.* 9, 959-962.

Conradt, B. und Horvitz, H.R. (1998). The *C. elegans* protein EGL-1 is required for programmed cell death and interacts with the Bcl-2-like protein CED-9. *Cell* 93, 519–529.

Cooley, L., Verheyen, E., Ayers, K. (1992). *Chickadee* encodes a profilin required for intercellular cytoplasm transport during *Drosophila* oogenesis. *Cell* 69, 173-184.

Corrigan, C., Subramanian, R., Miller, M.A. (2005). Eph and NMDA receptors control Ca²⁺/calmodulin-dependant protein kinase II activation during *C. elegans* oocyte meiotic maturation. *Development* 132(23), 5225-5237.

Cummings, M.R. und King, R.C. (1970). Ultrastructural changes in nurse and follicle cells during late stages of oogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* 110, 1–8.

Dahanukar, A. und Wharton, R.P. (1996). The *nanos* gradient in *Drosophila* embryos is generated by translational regulation. *Genes & Dev.* 10, 2610-2620.

David, C.N., Gierer, A. (1974). Cell cycle kinetics and development of *Hydra attenuata*: III. Nerve and nematocyte differentiation. *J. Cell Sci.* 16, 359-375.

David, C.N. und Murphy, S. (1977). Characterization of interstitial stem cells in *Hydra* by cloning. *Dev. Biol.* 58, 372–83.

DeCuevas, M., Lilly, M.A., Spradling, A.C. (1997). Germline cyst formation in *Drosophila*. *Annu. Rev. Genet.* 31, 405-428.

Dernburg, A.F., McDonald, K., Moulder, G., Barstead, R., Dresser, M., Villeneuve, A.M. (1998). Meiotic recombination in *C. elegans* initiates by a conserved mechanism and is dispensable for homologous chromosome synapsis. *Cell* 94, 387-398.

Ditzel, M., Wilson, R., Tenev, T., Zachariou, A., Paul, A., Deas, E., Meier, P. (2003). Degradation of DIAP1 by the N-end rule pathway is essential for regulating apoptosis. *Nat. Cell Biol.* 5, 467–473.

Dorstyn, L., Read, S.H., Cakouros, D., Huh, J.R., Hay, B.A., Kumar, S. (2002). The role of cytochrome c in caspase activation in *Drosophila melanogaster* cells. *J. Cell Biol.* 156, 1089–1098.

Downing, E. (1909). The ovogenesis of *Hydra*. Zool. Zb. Anat. Ontog. 28, 295-322.

Downs, S.M. und Hunzicker-Dunn, M. (1995). Differential regulation of oocyte maturation und cumulus expansion in the mouse oocyte-cumulus cell complex by site-selective analogs of cyclic adenosine monophosphate. Dev. Biol. 172(1), 72-85.

Drummond-Barbosa D. und Spradling A.C. (2001). Stem cells and their progeny respond to nutritional changes during *Drosophila* oogenesis. Dev Biol. 231, 265–278.

Dworak, H.A. und Sink, H. (2002). Myoblast fusion in *Drosophila*. Bioassays 24, 591-601.

Eddy, E. M. (1975). Germ plasm and the differentiation of the germ cell line. Int. Rev. Cytol. 43, 229-280.

Ellis, H.M. und Horvitz, H.R. (1986). Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. Cell 44, 817–829.

Fawcett, D.W., Ito, S., Slautterback, D. (1959). The occurrence of intercellular bridges in groups of cells exhibiting synchronous differentiation. J. Biophys. Biochem. Cytol. 5, 453-460.

Foley, K. und Cooley, L. (1998). Apoptosis in late stage *Drosophila* nurse cells does not require genes within the H99 deficiency. Development 125, 1075-1082.

Fröbisch, A.C., Genikhovich, G., Kurn, U., Anton Erxleben, F., Bosch, T.C. (2003). Expression of developmental genes during early embryogenesis of *Hydra*. Dev. Genes Evol. 213, 445-455.

- Gavis, E.R., Lunsford, L., Bergsten, S.E., Lehmann R. (1996). A conserved 90 nucleotide element mediates translational repression of *nanos* RNA. *Development* 122, 2791–2800.
- Gavrieli, Y., Sherman, Y., Ben-Sasson, S.A. (1992). Identification of programmed cell death in situ via specific labelling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biol.* 119, 493–501.
- Gibert, M.A., Starck, J., Beguet, B. (1984). Role of the gonad cytoplasmic core during oogenesis of the nematode *C. elegans*. *Biol. Cell* 50(1), 77-85.
- Giorgi, F. und Deri, P. (1976). Cell death in ovarian chambers of *Drosophila melanogaster*. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 35, 521–533.
- Gönczy, P. und Rose, L.S. (2005). Asymmetric cell division and axis formation in the embryo. *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, *WormBook*, doi/10.1895/wormbook.1.30.1, <http://www.wormbook.org>.
- Gruidl, M. E., Smith, P. A., Kuznicki, K. A., McCrone, J. S., Kirchner, J., Roussell, D. L., Strome, S., Bennett, K. L. (1996). Multiple potential germ-line helicases are components of the germ-line- specific P granules of *C. elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 13837-13842.
- Gruzova, M.N. (1956). New data concerning embryogenesis in *Hydra vulgaris*. *Dokl. Akad. Nauk.* 109, 670-672.
- Gruzova, M.N. und Parfenov, V.N. (1993). Karyosphere in oogenesis and intranuclear morphogenesis. *Int. Rev. Cytol.* 144, 1-52.
- Grün, G. (1972). Über den Eidimorphismus und die Oogenese von *Dinophilus gyrociliatus* (Archiannelida). *Z. Zellforsch.*, 70-92.

Gumienny, T.L., Lambie, E., Hartweg, E., Horvitz, H.R., Hengartner, M.O. (1999). Genetic control of programmed cell death in the *Caenorhabditis elegans* hermaphrodite germline. *Development* 126, 1011-1022.

Gutzeit, H.O. (1986a). The role of microfilaments in cytoplasmic streaming in *Drosophila* follicles. *J. Cell Sci.* 80, 159-169.

Hay, B., Ackerman, L., Barbel, S., Jan, L. Y., Jan, Y. N. (1988a). Identification of a component of *Drosophila* polar granules. *Development* 103, 625-640.

Hay, B., Jan, L.Y., Jan Y.N. (1990). Localization of *vasa*, a component of *Drosophila* polar granules, in maternal-effect mutants that alter embryonic anteroposterior polarity. *Development* 109, 425-433.

Hengartner, M.O. (1997). Apoptosis. CED-4 is a stranger no more. *Nature* 388(6644), 714-715.

Hird, S.N., Paulsen, J.E., Strome, S. (1996). Segregation of germ granules in living *C. elegans* embryos: cell-type-specific mechanisms for cytoplasmic localisation. *Development* 122(4), 1303-1312.

Hobmayer, B., Rentzsch, F., Holstein, T.W. (2001). Identification and expression of *HySmad-1*, a member of the R-Smad family of TGF-beta signal transducers, in the diploblastic metazoan *Hydra*. *Dev. Genes Evol.* 211, 597-602.

Honegger, T.G., Zürrer, D., Tardent, P. (1989). Oogenesis in *Hydra carnea*: A new model based on light and electron microscopic analyses of oocyte and nurse cell differentiation. *Tissue and Cell* 21, 381-393.

Horne-Bardovinac, S. und Bilder, D. (2005). Mass transit: epithelial morphogenesis in the *Drosophila* egg chamber. *Dev. Dyn.* 232, 559-574.

Huettnner, A.F. (1923). The origin of the germ cells in *Drosophila melanogaster*. J. Morphol. 2, 385-422.

Igaki, T., Kanda, H., Yamamoto-Goto, Y., Kanuka, H., Kuranaga, E., Aigaki T., Miura M. (2002). Eiger, a TNF superfamily ligand that triggers the *Drosophila* JNK pathway. EMBO J. 21, 3009–3018.

Ikenishi, K. und Tanaka, T.S. (1997). Involvement of the protein of *Xenopus vasa* homolog (*Xenopus vasa*-like gene 1, *XVLG-1*) in the differentiation of primordial germ cells. Develop. Growth Differ. 39, 625-633.

Ikenishi, K. und Tanaka, T.S. (2000). Spatio-temporal expression of *Xenopus vasa* homolog, *XVLG-1*, in oocytes and embryos: The presence of *XVLG1* RNA in somatic cells as well as germline cells. Develop. Growth Differ. 42, 95-103.

Illmensee, K. und Mahowald, A. P. (1974). Transplantation of posterior polar plasm in *Drosophila*. Induction of germ cells at the anterior pole of the egg. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 1016-1020.

Jones, D.H., Ley, S., Aitken, A. (1995). Isoforms of 14-3-3 protein can form homo- and heterodimers in vivo and in vitro: implications for function as adapter proteins. FEBS Lett. 368(1), 55-58.

Kanda, H., Igaki, T., Kanuka, H., Yagi, T., Miura, M. (2002). Wengen, a member of the *Drosophila* tumor necrosis factor receptor superfamily, is required for Eiger signaling. J. Biol. Chem. 277, 28372–28375.

Kanuka, H., Sawamoto, K., Inohara, N., Matsuno, K., Okano, H., Miura, M. (1999). Control of the cell death pathway by Dapaf-1, a *Drosophila* Apaf-1/CED-4-related caspase activator. Mol. Cell 4, 757–769.

Kauppila, S., Maaty, W.S., Chen, P., Tomar, R.S., Eby, M.T., Chapo, J., Chew, S., Rathore, N., Zachariah, S., Sinha, S.K., Abrams, J.M., Chaudhary, P.M. (2003). Eiger and its receptor, Wengen, comprise a TNF-like system in *Drosophila*. *Oncogene* 22, 4860–4867.

Kawasaki, I., Shim, Y. H., Kirchner, J., Kaminker, J., Wood, W. B., Strome, S. (1998). PGL-1, a predicted RNA-binding component of germ granules, is essential for fertility in *C. elegans*. *Cell* 94, 635-645.

Kawasaki, I., Amiri, A., Fan, Y., Meyer, N., Dunkelbarger, S., Motohashi, T., Karashima, T., Bossinger, o., Strome, S. (2004). The PGL family proteins associate with germ granules and function redundantly in *C. elegans* germline development. *Genetics* 167(2), 645-661.

Kimble, J.E. und White, J.G. (1981). On the control of germ cell development in *C. elegans*. *Dev. Biol.* 81, 208-219.

King, R. C. (1970). *Ovarian Development in Drosophila melanogaster*. New York: Academic Press.

Kleinenberg, N. (1872). „*Hydra*. Eine anatomisch-entwicklungsgeschichtliche Untersuchung.“ Verlag von Wilhelm Engelmann, Leipzig.

Kobayashi, S., Amikura, R. and Okada, M. (1993). Presence of mitochondrial large ribosomal RNA outside mitochondria in germ plasm of *D. melanogaster*. *Science* 260, 1521-1524.

Kornbluth, S. und White, K. (2005). Apoptosis in *Drosophila*: Neither fish nor fowl (nor man, nor worm). *J. Cell Sci.* 118, 1779–1787.

Kuznetsov, S.G., Anton-Erxleben, F., Bosch, T.C.G. (2002). Epithelial interactions in *Hydra*: apoptosis in interspecies grafts is induced by detachment from the extracellular matrix. J. Exp. Biol. 205, 3809-3817.

Kuznicki, K. A., Smith, P. A., Leung-Chiu, W. M., Estevez, A. O., Scott, H. C., Bennett, K. L. (2000). Combinatorial RNA interference indicates GLH-4 can compensate for GLH- 1; these two P granule components are critical for fertility in *C. elegans*. Development 127, 2907-2916.

Kükenthal, Zoologisches Grundpraktikum; Gustav Fischer Verlag, 22.Auflage.

Landau (1999). Growth factor promotes life by halting cell death machinery. News from Harvard Medical, Dental and Public Health Schools; Neurology. April 2.

Lasko, P.F. und Ashburner, M. (1988). The product of the *Drosophila* gene *vasa* is very similar to eucaryotic initiation factor-4A. Nature 335, 611-617.

Lasko, P.F. und Ashburner, M. (1990). Posterior localization of *vasa* protein correlates with, but is not sufficient for pole cell development. Genes Dev. 4, 905-921.

Laundrie, B., Peterson, J.S., Baum, J.S., Chang, J.C., Fileppo, D., Thompson, S., McCall, K. (2003). Germline cell death is inhibited by P element insertions in the dcp-1/pita nested gene pair in *Drosophila*. Genetics 165, 1881–1888.

Lehmann, R. und Nüsslein-Vollhard C. (1991). The maternal gene *nanos* has a central role in pattern formation in the *Drosophila* embryo. Development 112, 679-691.

Lettre, G., Kritikou, E.A., Jaeggi, M., Calixto, A., Fraser, A.G., Kamath, R.S.(2004). Genome-wide RNAi identifies p53-dependent and -independent regulators of germ cell apoptosis in *C. elegans*. Cell Death Differ. 11(11), 1198-1203.

Liang, L., Diehl-Jones, W., Lasko, P. (1994). Localisation of *vasa* protein in the *Drosophila* pole plasm is independent of its RNA-binding and helicase activities. *Development* 120, 1201-1211.

Littlefield, C.L. (1991). Cell lineages in *Hydra*: isolation and characterization of an interstitial stem cell restricted to egg production in *Hydra oligactis*. *Dev. Biol.* 143: 378-388.

Littlefield, C.L. (1994). Cell-cell interactions and the control of sex determination in *Hydra*. *Semin. Dev. Biol.* 5, 13-20.

Lüking, A., Stahl, U., Schmidt, U. (1998). The protein family of RNA helicases. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 33, 259–296.

Mahajan-Miklos, S. und Cooley, L. (1994). Intercellular cytoplasm transport during *Drosophila* oogenesis. *Dev. Biol.* 165, 336-351.

Mahajan-Miklos, S. Cooley, L. (1994a). The villin-like protein encoded by the *Drosophila quail* gene is required for actin bundle assembly during oogenesis. *Cell* 78, 291-301.

Mahowald, A.P. (1962). Fine structure of pole cells and polar granules in *D. melanogaster*. *J. Exp. Zool.* 151, 201-215

Mahowald, A.P. (1968). Polar granules of *Drosophila*: II. Ultrastructural changes during early embryogenesis. *J. Exp. Zool.* 167, 237-262.

Mahowald, A.P. (1971a). Polar granules of *Drosophila*: III. The continuity of polar granules during the life cycle of *Drosophila*. *J. Exp. Zool.* 176, 329-344.

Mahowald, A. P. (1971). Polar granules of *Drosophila*. IV. Cytochemical studies showing loss of RNA from polar granules during early stages of embryogenesis. J. Exp. Zool. 176, 345-352.

Mahowald, A. P. und Hennen, S. (1971). Ultrastructure of the 'germ plasm' in eggs and embryos of *Rana pipiens*. Dev. Biol. 24, 37-53.

Mahowald, A. P., Illmensee, K., Turner, F. R. (1976). Interspecific transplantation of polar plasm between *Drosophila* embryos. J. Cell Biol. 70, 358-373.

Margolis, J. und Spradling, A. (1995). Identification and behaviour of epithelial stem cells in the *Drosophila* ovary. Development 121, 3797-3807.

Markussen, F.H., Michon, A.M., Breitwieser, W., Ephrussi, A. (1995). Translational control of *oskar* generates Short OSK, the isoform that induces pole plasm assembly. Development 121, 3723-3732.

Martin, V. J., Littlefield, C. L., Archer, W. E., Bode, H. R. (1997). Embryogenesis in *Hydra*. Biol. Bull. 192, 345-363.

Masui, Y. (1985). Meiotic arrest in animal oocytes. Biology of Fertilization (Florida: Academic Press), 189-219.

Masui, Y., und Clarke, H.J. (1979). Oocyte maturation. Int. Rev. Cytol. 57, 185-282.

Matova, N. und Cooley, L. (2001). Comparative aspects of animal oogenesis. Dev. Biol. 231, 291-320.

Mazzalupo, S. und Cooley, L. (2006). Illuminating the role of caspases during *Drosophila* oogenesis. Cell Death Differ. 13, 1950-1959.

- McCall, K. und Peterson, J.S. (2004). Detection of apoptosis in *Drosophila*. *Methods Mol. Biol.* 282, 191–205.
- McCall, K. und Steller, H. (1998). Requirement for DCP-1 caspase during *Drosophila* oogenesis. *Science* 279, 230-234.
- McCarter, J., Bartlett, B., Dang, T. and Schedl, T. (1999). On the control of oocyte meiotic maturation and ovulation in *C. elegans*. *Dev. Biol.* 205, 111-128.
- Miller, M.A., Technau, U., Smith, K.M., Steele R.E. (2000). Oocyte development in *Hydra* involves selection from competent precursor cells. *Dev. Biol.* 224, 326-338.
- Miller, M.A., Ruest, P.J., Kosinski, M., Hanks, S.K., Greenstein, D. (2003). An Eph receptor sperm sensing control mechanism for oocyte meiotic maturation in *Caenorhabditis elegans*. *Genes Dev.* 17(2), 187-200.
- Mochizuki, K., Nishimiya-Fujisawa, C., Fujisawa, T. (2001). Universal occurrence of the *vasa*-related genes among metazoans and their germline expression in *Hydra*. *Dev. Genes Evol.* 211, 299-308.
- Moreno, E., Yan, M., Basler, K. (2002). Evolution of TNF signalling mechanisms: JNK-dependent apoptosis triggered by Eiger, the *Drosophila* homolog of the TNF superfamily. *Curr. Biol.* 12, 1263–1268.
- Müller-Taubenberger, A., Vos, M.J., Böttger, A., Lasi, M., Lai, F.P., Fischer, M. (2006). Monomeric red fluorescent protein variants used for imaging studies in different species. *Eur. J. Cell Biol.* 86(12), 1119-1129.
- Navarro, R.E., Shim, E.Y., Kohara, Y., Singson, A., Blackwell, T.K. (2001). Cgh-1, a conserved predicted RNA helicase required for gametogenesis and protection from physiological germline apoptosis in *C. elegans*. *Development* 128, 3221–3232.

Nezis, I.P., Stravopodis, D.J., Papassideri, I., Robert-Nicoud, M., Margaritis, L.H. (2000). Stage specific apoptotic patterns during *Drosophila* oogenesis. Eur. J. Cell Biol. 79, 610-620.

Noda, K. und Kanai, C. (1977). An ultrastructural observation of *Pelmatohydra robusta* at sexual and asexual stages, with a special reference to "germinal plasm". J. Ultrastruct. Res. 61, 284–294.

Okada, E. und Waddington, C.H. (1959). The submicroscopic structure of the *Drosophila* egg. J. Embryol. Exp. Morphol. 7, 583–597.

Pauly, B., Lasi, M., MacKintosh, C., Morrice, N., Imhof, A., Regula, J., Rudd, S., David, C.N., Böttger, A. (2007). Proteomic screen in the simple metazoan *Hydra* identifies 14-3-3 binding proteins implicated in cellular metabolism, cytoskeletal organisation and Ca²⁺ signalling. BMC Cell Biol. 8: 31.

Pauly, B., Stiening, B., Schade, M., Alexandrova, O., Zoubek, R., David, C.N. (2003). Molecular cloning and cellular distribution of two 14-3-3 isoforms from *Hydra*: 14-3-3 proteins respond to starvation and bind to phosphorylated targets. Exp. Cell Res. 285, 15–26.

Peterson, J.S., Barkett, M., McCall, K. (2003). Stage-specific regulation of caspase activity in *Drosophila* oogenesis. Dev. Biol. 260, 113–123.

Peterson, J.S., Bass, B.P., Jue, D., Rodriguez, A., Abrams, J.M., McCall, K. (2007). Noncanonical cell death pathways act during *Drosophila* oogenesis. Genesis 45, 396-404.

Pitt, J. N., Schisa, J. A., Priess, J. R. (2000). P granules in the germ cells of *C. elegans* adults are associated with clusters of nuclear pores and contain RNA. Dev. Biol. 219, 315-333.

Ray, R.P. und Schüpbach, T. (1996). Intercellular signaling and the polarisation of body axes during *Drosophila* oogenesis. *Genes Dev.* 10, 1711-1723.

Rentzsch, F., Hobmayer, B., Holstein, T.W. (2005). Glycogen synthase kinase 3 has a pro-apoptotic function in *Hydra* gametogenesis. *Dev. Biol.* 278, 1-12.

Rodriguez, A., Chen, P., Oliver, H., Abrams, J.M. (2002). Unrestrained caspase-dependent cell death caused by loss of Diap1 function requires the *Drosophila* Apaf-1 homolog, Dark. *EMBO J.* 21, 2189–2197.

Rongo, C., Gavis, E.R., Lehmann, R. (1995). Localization of *oskar* RNA regulates *oskar* translation and requires Oskar protein. *Development* 121, 2737-2746.

Roussell, D.L. und Bennett, K.L. (1993). Glh-1, a germ-line putative RNA helicase from *C. elegans*, has four zinc fingers. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA* 90(20), 9300-9304.

Ryoo, H.D., Bergmann, A., Gonen, H., Ciechanover, A., Steller, H. (2002). Regulation of *Drosophila* IAP1 degradation and apoptosis by reaper and ubcD1. *Nat. Cell Biol.* 4, 432–438.

Saffman, E.E. und Lasko, P. (1999). Germline development in vertebrates and invertebrates. *Cell. Mol. Life Sci.* 55, 1141-1163.

Santos, A. und Lehmann, R. (2004). Germ cell specification and migration in *Drosophila* and beyond. *Curr. Biol.* 14, R578-R589.

Schedl, T. (1997). Developmental genetics of the early germ line. In *C. elegans II* (eds. D.L. Riddle, T. Blumenthal, B. Meyer, and J. Priess). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Press, 241–269.

Schisa, J.A., Pitt, J.N., Priess, J.R. (2001). Analysis of RNA associated with P granules in germ cells of *C. elegans* adults. *Dev.* 128, 1287-1298.

Schüpbach, T. und Wieschaus, E. (1986). Maternal-effect mutations altering the anterior-posterior pattern of the *Drosophila* embryo. Roux`s Arch. Dev. Biol. 195, 302-317.

Shibata, N., Umesono, Y., Orii, H., Sakurai, T., Watanabe, K., Agata, K. (1999). Expression of *vasa* (*vas*)-related genes in germline cells and totipotent somatic stem cells of planarians. Dev. Biol. 206, 73-87.

Smith III, J.E., Cummings, C.A., Cronmiller, C. (2002). Daughterless coordinates somatic cell proliferation, differentiation and germline cyst survival during follicle formation in *Drosophila*. Development 129, 3255–3267.

Sonnenblick, B.P. (1941). Germ cell movements and sex differentiation of the gonads in the *Drosophila*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 27, 484–489.

Spector, M.S., Desnoyers, S., Hoepfner, D.J., Hengartner, M.O. (1997). Interaction between the *C. elegans* cell-death regulators CED-9 and CED-4. Nature 385, 653–656.

Spradling, A.C., DeCuevas, M., Drummond-Barbosa, D., Keyes, L., Lilly, M. (1997). The *Drosophila* germlarium: stem cells, germline cysts and oocytes. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 62.

Springer, J.E., Azbill, R.D., Nottingham, S.A., Kennedy, S.E. (2000). Calcineurin-mediated BAD dephosphorylation activates the caspase-3 apoptotic cascade in traumatic spinal cord injury. J. Neurosci. 20(19), 7246-7251.

Starck, J. (1977). Radioautographic study of RNA synthesis in *C. elegans* (Bergerac variety) oogenesis. Biol. Cell. 30, 181-182.

Strome, S. und Lehmann, R. (2007). Germ versus soma decisions: lessons from flies and worms. Science 316, 392-393.

Strome, S. und Wood, W. B. (1982). Immunofluorescence visualization of germ-line-specific cytoplasmic granules in embryos, larvae, and adults of *C. elegans*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 1558-1562.

Styhler, S., Nakamura, A., Lasko, P. (2002). Vasa localization requires the SPRY-domain and SOCS-box containing protein, Gustavus. Dev. Cell 3, 865-876.

Styhler, S., Nakamura, A., Swan, A., Suter, B., Lasko, P. (1998). Vasa is required for gurken accumulation in the oocyte, and is involved in oocyte differentiation and germline cyst development. Development 125, 1569-1578.

Sulston, J.E., Schirenberg, E., White, J.G., Thomson, J.E. (1983). The embryonic cell lineage of the nematode *C. elegans*. Dev. Biol. 100, 64-119.

Technau, U., Miller, M.A., Bridge, D., Steele, R.E. (2003). Arrested apoptosis of nurse cells during *Hydra* oogenesis and embryogenesis. Dev. Biol. 260, 191-206.

Tomancak, P., Guichet, A., Zavorszky, P., Ephrussi, A. (1998). Oocyte polarity depends on regulation of *gurken* by Vasa. Development 125, 1723-1732.

Varkey, J., Chen, P., Jemmerson, R., Abrams, J.M. (1999). Altered cytochrome c display precedes apoptotic cell death in *Drosophila*. J. Cell Biol. 144, 701-710.

Wager, R. (1909). The oogenesis and early development of *Hydra*. Biol. Bull. 18, 1-39.

Wickramasinghe, D. und Albertini, D.F. (1993). Cell cycle control during mammalian development. Curr. Top. Dev. Biol. 28, 125-153.

Wilson, R., Goyal, L., Ditzel, M., Zachariou, A., Baker, D.A., Agapite, J., Steller, H., Meier, P. (2002). The DIAP1 ring finger mediates ubiquitination of Dronc and is indispensable for regulating apoptosis. Nat. Cell Biol. 4, 445-450.

- Witten, S.J. und Miller M.A. (2007). The role of gap junctions in *Caenorhabditis elegans* oocyte maturation and fertilization. *Dev. Biol.* 301(2), 432-446.
- Wolf, N., Priess, J., Hirsh, D. (1983). Segregation of germline granules in early embryos of *C. elegans*: an electron microscopic analysis. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 73, 297-306.
- Wylie, C. (1999). Germ cells. *Cell* 96, 165-174.
- Yan, N., Gu, L., Kokel, D., Chai, J., Li, W., Han, A., Chen, L., Xue, D., Shi, Y. (2004). Structural, biochemical, and functional analyses of CED-9 recognition by the pro-apoptotic proteins EGL-1 and CED-4. *Mol. Cell* 15, 999–1006.
- Zihler, J. (1972). Zur Gametogenese und Befruchtungsbiologie von *Hydra*. Wilhelm Roux`s Arch. 169, 239-267.
- Zimmerman, K.C., Ricci, J.E., Droin, N.M., Green, D.R. (2002). The role of ARK in stress-induced apoptosis in *Drosophila* cells. *J. Cell Biol.* 156, 1077–1087.
- Zhou, L., Song, Z., Tittel, J., Steller, H. (1999). HAC-1, a *Drosophila* homolog of APAF-1 and CED-4 functions in developmental and radiation induced apoptosis. *Mol. Cell* 4, 745–755.

7. PUBLIKATIONEN

David ,C.N., Schmidt, N., Schade, M., Pauly, B., Alexandrova, O., Böttger, A. Hydra and the evolution of apoptosis. Integr. Comp. Biol. 2005 Aug; 45(4): 631-638.

Alexandrova, O., Schade, M., Böttger, A., David, C.N. Oogenesis in Hydra: nurse cells transfer cytoplasm directly to the growing oocyte. Dev. Biol. 2005 May 1; 281(1): 91-101.

Pauly, B., Stiening, B., Schade, M., Alexandrova, O., Zoubek, R., David, C.N., Böttger, A. Molecular cloning and cellular distribution of two 14-3-3 isoforms from Hydra: 14-3-3 proteins respond to starvation and bind to phosphorylated targets. Exp. Cell Res. 2003 Apr 15; 285(1): 15-26.

Böttger, A., Alexandrova, O., Cikala, M., Schade, M., Herold, M., David, C.N. GFP expression in Hydra: lessons from the particle gun. Dev. Genes Evol. 2002 Jul; 212(6): 302-5.

8. LEBENS LAUF

Marsha Schade
Schiltbergerstr. 2
81667 München
Tel.: 089/44449664
Email: schade@bio.lmu.de

geb. am 25.12.1974
in Neumünster
Staatsangehörigkeit deutsch

01/2007-03/2008**Studium und Beruf**

Abschluss der Promotionsarbeit
Stipendium der *LMU München*

02/2005-12/2006

Mutterschutz und Elternzeit

08/2002-01/2005

Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Bereich
der Zellbiologie *LMU München*
Beginn der Promotionsarbeit: „Oogenese in *Hydra vulgaris*“

04/1997-07/2002

Biologiestudium
Grundstudium *Universität Hamburg*
Hauptstudium *LMU München*

Hauptfach: Zellbiologie
Nebenfächer: Pharmakologie & Toxikologie
 Anthropologie & Humangenetik
 Immunologie

Diplomarbeit: „14-3-3 Proteine in *Hydra vulgaris*“

Gesamtnote: 1,4

Überbrückung der Wartezeit für einen Studienplatz in der Biologie

09/1996-03/1997

Studium der medizinischen Informatik
Medizinische Universität zu Lübeck

01/1995-08/1996

Servicekraft, Gastronomie

10/1994-12/1994

Auslandsaufenthalt Frankreich (Urlaub und Sprachreise)

07/1994-09/1994

sprachliche Weiterbildung

Schule

1994

Abitur am *Trave-Gymnasium Lübeck*

Weiterbildungen

01/2003-05/2003

„Intellectual Property Management“:
 Patentierung, Patentrecherche und
 -anmeldeverfahren *LMU München*

10/2001-04/2002

01/2001-07/2001

09/1998-04/1999

Tätigkeiten zur Finanzierung des Studiums

studentische Hilfskraft, *LMU München*

Henschel & Edelmann, PR Agentur, München

P&R Concept, TelDaFax, Hamburg

Sprachkenntnisse

Englisch fließend in Wort und Schrift

Französisch (Grundkenntnisse)

EDV – Kenntnisse

Windows vista, MS Office und Access

Adobe Photoshop und Illustrator, ImageJ

Gängige Sequenzanalyseprogramme

9. DANKSAGUNG

Zuerst möchte ich mich bei Angelika Böttger bedanken. Ihre Motivation ein Promotionsstipendium im Rahmen des HWP bei der LMU zu beantragen hat mir nach der „Babypause“ den Wiedereinstieg in meine Arbeit erheblich erleichtert. Ohne ihre Unterstützung wäre mir dieser nicht so schnell gelungen. Auch während meiner anfänglichen Startschwierigkeiten war sie es, die mich mit „Projekten“ und Vorschlägen für den Einstieg ins Thema immer weiter am Ball gehalten hat.

Ich möchte mich auch bei Charles N. David bedanken. Er war es, der schon während des Studiums mein Interesse für die Zellbiologie geweckt hat. Seine „fantastics“ haben mich während meiner ganzen Labortätigkeit immer wieder aufs neue motivieren können. Er hat mich oft damit beeindruckt, was er bei dem ersten Blick durchs Mikroskop alles entdecken kann (Dinge die mir nach stundenlanger Betrachtung vorher nicht aufgefallen waren!). Danke auch für die Hilfe beim Schreiben des Papers und für die Unterstützung bei der Bewerbung für das Stipendium.

Olga Alexandrova möchte ich dafür danken, dass sie mich zur Mikroskopie gebracht hat. Durch die gemeinsame Arbeit mit ihr wurde das „Projekt Oogenese“ erst ins Leben gerufen. Sie ist die Ideengeberin für zahlreiche Versuche. Ohne Ihre Unterstützung hätte ich diese Doktorarbeit nicht machen können.

Ich möchte mich bei der Frauenbeauftragten der LMU, Prof. Dr. Mitzdorf für die Bewilligung des Promotionsstipendiums im Rahmen des HWP bedanken. Das sechsmonatige Stipendium hat mir den Wiedereinstieg in meine wissenschaftliche Arbeit ermöglicht.

Zum Schluss möchte ich auch noch meiner kleinen Familie Danke sagen. Danke für die Unterstützung und Geduld und vor allen Dingen für den Glauben daran, dass ich es doch noch schaffe diese Arbeit zu Ende zu bringen. Diesen Glauben hatte ich nämlich zwischendurch schon verloren. Der Wiedereinstieg in das Thema fiel mir unglaublich schwer. Nach mehreren Monaten hatte ich zwar täglich gearbeitet, aber irgendwie doch nichts Richtiges „zu Papier“ gebracht. Das war sehr frustrierend. Eure Liebe und Fröhlichkeit hat mir aus diesen Tiefs herausgeholfen. Ich bin unbeschreiblich glücklich euch beide zu haben.